Versuche der Zerlegung von Aminosäuregemischen durch Dialyse

Inauguraldissertation
der philosophischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Charles Arber
von Oftringen

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen.

Bern, den 17. Februar 1944.

Der Dekan:
Prof. Dr. R. Signer.

Graphische Anstalt Schüler A.G. Biel 1944

Versuche der Zerlegung von Aminosäuregemischen durch Dialyse

Inauguraldissertation
der philosophischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Charles Arber
von Oftringen

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen.

Bern, den 17. Februar 1944.

Der Dekan:
Prof. Dr. R. Signer.

Graphische Anstalt Schüler A.G. Biel 1944

Meinen lieben Eltern
Meiner lieben Braut

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde im organisch-chemischen Institut der Universität Bern vom Herbst 1941 bis Herbst 1943 unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. R. Signer

ausgeführt. Herr Prof. Signer hat meiner Arbeit stets reges Interesse entgegengebracht und mich mit zahlreichen wertvollen Ratschlägen unterstützt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durch Beiträge aus einem Industriefond ermöglicht. Diese Zuwendungen seien an dieser Stelle ebenfalls bestens verdankt.

Ferner gedenke ich dankbar all derer, die mir während der Arbeit, die durch den Aktivdienst oft unterbrochen wurde, in guter Kameradschaft zur Seite gestanden sind.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung Seite 7

I. Wahl und Reinigung des Eiweissstoffes 11

II. Spaltung der Eiweissstoffe

A. Ueberblick über die frühern Beobachtungen

1. Säuren

Schwefelsäure 12

Salzsäure 14

andere Mineralsäuren 15

organische Säuren 16

2. Basen 17

3. Andere Stoffe 17

4. Fermente 18

B. Eigene Versuche

Schwefelsäure versch. Konz. 20

50 %ige Schwefelsäure in verschiedenen Mengen 22

Aequivalentgewichtsbestimmungen beim Abbau des Caseins mit 50 %-iger Schwefelsäure 23

Versuche mit andern Reagenzien 25

C. Der Abbau einer grössern Menge Casein 27

III. Sterilisation des Hydrolysates

Einleitung 32

1. Kupfersalze

Literatur 34

Sterilisationsversuche mit Kupfersalzen der Aminosäuren 35

2. Formaldehyd als Desinfektionsmittel

a) Literatur 37

b) Versuche

Sterilisationsversuche 43

Entfernung des Formaldehyds aus Aminosäuren-Formaldehydgemisch 45

Entfernung des Formaldehyds aus Hydrolysat-Formaldehydgemisch 47

Entfernung des Formaldehyds aus Hydrolysat-Formaldehydgemischen nach verschiedenen Reaktionszeiten 49

Versuche zum Nachweis des nicht erfassbaren Formaldehyds:

Prüfung auf Gewichtserhöhung des Trockenrückstandes 54

Prüfungs auf Bildung von Ameisensäure 56

IV. Dialyse

A. Prinzip 58

B. Bisherige Ergebnisse 59

C. Das Bauprinzip des hier verwendeten Dialysators 60

D. Das Aminosäuregemisch als Objekt für den Dialysator 65

E. Durchführung der Dialyse 68

Aufarbeitung der Fraktionen 68

Betriebsbedingungen und tägliche Ausbeuten 69

V. Identifizierung der Fraktionen

Einleitung 72

A. Frühere Beobachtungen über das kryoskopisch bestimmte Molekulargewicht der Aminosäuren

einzelne Aminosäuren 74

Aminosäurengemische 80

B. Eigene Versuche

Apparatur 83

1. Bestimmung der Molekulargewichte reiner Aminosäuren 84

2. Bestimmung der Molekulargewichte der Dialysatfraktionen

Kristallisationsversuche 85

Molekulargewichtsbestimmungen der Fraktionen 87

Zusammenfassung 90

Literatur 92

Einleitung

In jeder lebenden Zelle des Tier- und Pflanzenreiches kommen Eiweissstoffe vor. Sie gehören wohl zur biologisch wichtigsten und interessantesten Gruppe hochmolekularer Stoffe. Ihre Konstitution ist wenig aufgeklärt im Vergleich zu andern hochmolekularen Naturstoffen wie zum Beispiel den polymeren Kohlehydraten oder den Isoprenderivaten.

Sicher steht die Art der Bausteine. Es sind vorwiegend Aminosäuren. Im Jahre 1820 wurde von Braconnot die erste Aminosäure, das Glykokoll aus der Gelatine isoliert (1). Von Liebig kam 1846 das Tyrosin hinzu, welches er aus Käse isolierte (2). Bis zum Jahre 1871 waren nur wenige Aminosäuren bekannt (3). Um die Jahrhundertwende erfuhr die Eiweisschemie einen grossen Aufschwung durch Emil Fischer, welcher die Zahl der Aminosäuren auf 14 erhöhte (4). Viele Forscher haben sich im folgenden mit der Konstitution der Eiweisse befasst und neue Aminosäuren entdeckt. Heute sind ca. 25 bekannt. Die zuletzt aufgefundene ist das Lanthionin (5).

Umstritten war bis vor kurzem das Verknüpfungsprinzip der Bausteine. Am besten gestützt ist die Auffas-

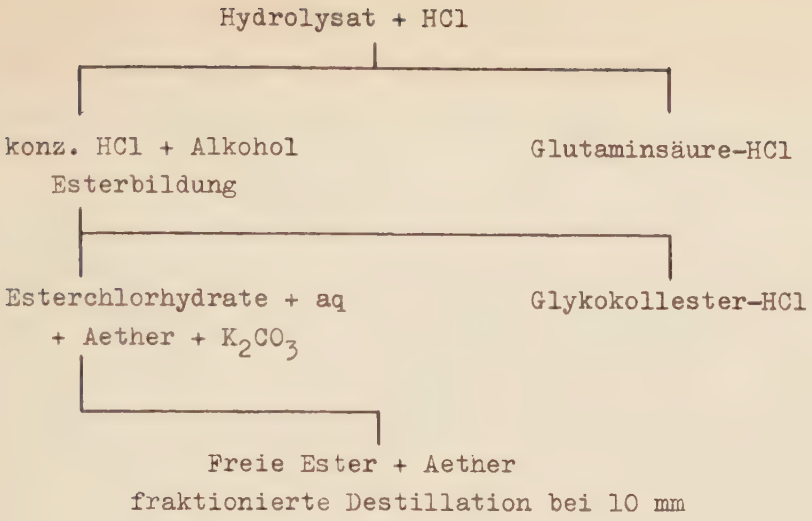
sung der Peptidbindung, die von Hofmeister [6] aufgestellt und von Emil Fischer bestätigt wurde. Abderhalden stellte die Theorie der Diketopiperazine auf [8], welche aber von Waldschmidt-Leitz widerlegt wurde [9].

Ein genaues Eindringen in die Konstitution der Eiweissstoffe setzt das Erfassen aller Bausteine voraus. Dieses Problem ist noch nicht befriedigend gelöst. Schwierigkeiten bieten besonders die Spaltung der Eiweissstoffe und die Aufarbeitung des Hydrolysates.

Die vorliegende Arbeit möchte einen Beitrag dazu leisten. Der Anstoss zu diesen Untersuchungen wurde durch ein neues physikalisches Verfahren zur Trennung von Gemischen gegeben, der Dialyse.

Bis jetzt konnte nur mit grösster Mühe eine Trennung der Aminosäuren vorgenommen werden. Am erfolgreichsten war um die Jahrhundertwende die Estermethode nach E. Fischer:

Das salzsaure Hydrolysat wird konzentriert und scheidet bei Einleiten von Salzsäuregas Glutaminsäure als Hydrochlorid aus [4]. Die salzsaure Mutterlauge wird mit Alkohol verestert und der fraktionierten Destillation unterworfen. Folgendes Schema orientiert über den Trennungsgang:



1. Fraktion: bis 40°
Aether, Glykokollester.

2. Fraktion: 40 - 60°
Alaninester.

3. Fraktion: 60 - 90°
Prolin-, Leucin-, Valinester.

4. Fraktion: über 100°
Serin-, Phenylalanin-, Asparaginsäureester.

Rückstand:
undefinierbar.

Verbessert wurde diese Methode durch Dakin, welcher die Monoaminosäuren mit Butylalkohol extrahiert[10]. Benützt wird auch die verschiedene Löslichkeit der Kupfersalze in Wasser und Methylalkohol (Trennung nach Town [11]). Im Jahre 1942 wurde durch Ross [12] das Eiweiss des Tabakmosaikvirus analysiert. Hier wurden alle bis heute bekannten Methoden kombiniert.

Die Trennung von Stoffgemischen mit einem Stufendialysator, die von Koestler [13] ausgearbeitet wurde, konnte mit grossem Erfolg auf ein binäres Salzgemisch angewendet werden [14].

Die vorliegende Arbeit untersuchte ein viel komplexeres Gemisch. Gewählt wurde das Hydrolysat eines sehr gut untersuchten und leicht zugänglichen Eiweisses. Dies sollte weiter viele Aminosäuren enthalten. Es wurde das Casein gewählt, über das eine ausführliche Monographie vor kurzem erschien [15].

Bei der Aufgabe, die Aminosäuren aus einem Eiweiss quantitativ zu erfassen, tritt nicht nur die Schwierigkeit der Zerlegung des Säurengemisches auf. Es ist überdies auch darauf zu achten, dass bei der Zerlegung des Proteins keine Nebenprodukte wie Humine etc. entstehen. Auch diesem Problem wurde einige Aufmerksamkeit geschenkt.

Die Anwendung des Dialysators zur Zerlegung des Aminosäurengemisches rief noch einem weitern Problem. Da die Dialyse lange Zeit in Anspruch nimmt und bei Zimmertemperatur durchgeführt wird, müssen die Lösungen desinfiziert werden. Es war deshalb ein Bakteriengift zu suchen, das aus den Aminosäuren wieder restlos entfernt werden konnte.

I. Wahl und Reinigung des Eiweissstoffes

Die Wahl des Caseins als Eiweissstoff wurde schon in der Einleitung begründet.

Dieses wird nach Hammarsten (16) wie folgt gewonnen:

Frische Kuhmilch wird zentrifugiert, und die Magermilch wird mit Essigsäure versetzt, bis das p_H 4,6 beträgt. Dadurch erfolgt die Fällung des Caseins als käsiger Niederschlag, der noch Fett eingeschlossen enthält. Dieser wird in verdünnter Natronlauge gelöst und wiederum mit Essigsäure gefällt. Mehrfach umgefälltes Casein ist aber noch nicht fettfrei. Bei jeder Fällung werden erneut Fettropfen eingeschlossen und adsorbiert. Ein direktes Extrahieren mit Aether hat keinen grossen Effekt, weil dieser nur mässig eindringen kann. Wenn aber zuerst Casein mit Wasser zur Quellung gebracht wird, so kann dieses durch Alkohol, und der Alkohol nachher durch Aether verdrängt werden. Hiebei kann das Extraktionsmittel genügend in das Eiweiss eindringen und das Fett herauslösen. Nach diesem Verfahren konnte aus lufttrockenem, nach Hammarsten mehrfach umgefällten Casein 0,9 % Fett extrahiert werden.

II. Spaltung der Eiweissstoffe

A. Ueberblick über die frühern Beobachtungen

Die wichtigsten Methoden für die Spaltung sind:

1. Säuren
2. Basen
3. Andere Stoffe
4. Fermente

1. Die Säuren

Mit Schwefelsäure wurde schon im Jahre 1820 die Gelatine abgebaut (1). Mit konzentrierter Schwefelsäure werden Proteine wie Casein bei Zimmertemperatur nur unvollständig abgebaut. Menge und Konzentration der Säure sind von bedeutendem Einfluss:

Aus der ältern Literatur seien folgende Angaben erwähnt:

Wird Casein mit der zehnfachen Menge 60 % Schwefelsäure bei Zimmertemperatur behandelt, so geht es nach kurzer Zeit in Lösung. Um die fortschreitende Hydrolyse

zu verfolgen, wurden von Zeit zu Zeit aliquote Proben in gleiche Teile Wasser gegossen und mit Ammoniak neutralisiert [17]. Dabei fiel unverändertes oder nur wenig abgebautes Casein aus. Die Fällungen wurden auf Prozente des Ausgangsmaterials umgerechnet:

nach 39 Stunden	89,2 %
nach 78 Stunden	66,3 %
nach 126 Stunden	49,5 %
nach 198 Stunden	40,8 %

Casein löst sich in einer halben Stunde in der 15-fachen Menge 60 oder 70 %iger Schwefelsäure. In 50 %iger Säure geht die Auflösung schon merklich langsamer. Auch hier schreitet der Abbau mit der Zeit weiter, was aus den Abnahmen der bei der Neutralisation ausfallenden Mengen zu ersehen ist:

Tabelle 1: Caseinabbau mit Schwefelsäure bei 20°

Konzentration der Säure	nicht abgebaut nach		
	24	72	96 Std.
70 %	71 %	58 %	50 %
60 %	86 %	45 %	46 %

Wurde Casein während drei Tagen mit der sechsfachen Menge 60 %iger Schwefelsäure bei Zimmertemperatur stehen gelassen, so schieden sich bei der Neutralisation mit Ammoniak Albumosen aus [18].

Bei der Hydrolyse mit 50 %iger Schwefelsäure über 18 Tage bei 38° konnten aus 500 g Casein 3 Gramm ei-

nes Tripeptides isoliert werden [19].

Wie zu erwarten ist, bewirkt Temperaturerhöhung eine Reaktionsbeschleunigung:

Es gelang aus einem Caseinhydrolysat, welches mit 10 %iger Schwefelsäure bei 80° dargestellt wurde, geringe Mengen eines Tripeptides zu isolieren [20].

Heisse konzentrierte Schwefelsäure bildete bei der Hydrolyse keine Huminsubstanzen. Dafür trat im Hydrolysat Brenztraubensäure auf [21].

Aus diesem Grunde kommen bei Siedetemperatur nur Säurekonzentrationen von 25 - 30 % zur Anwendung [22-25]. Bei diesen Konzentrationen werden die Proteine bis zu den Aminosäuren zerlegt. Anschliessend kann die Säure leicht mit Barytlauge aus dem Hydrolysat entfernt werden.

Die Salzsäure wurde gegen Ende des letzten Jahrhunderts eingeführt [26]. Je nach der Methode der Zerlegung des Aminosäurengemisches wird die salzsaure Lösung verschieden behandelt. Die Salzsäure kann entweder mit Kupferoxydul und Silberoxyd entfernt [27], oder im Vacuum wegdestilliert werden [12]. Nach Emil Fischer konzentriert man das salzsaure Hydrolysat und leitet zum Ausfällen der Glutaminsäure Salzsäuregas ein. Bei der Veresterung mit Alkohol scheidet sich der salzsaure Ester des Glykokolls aus. Erst jetzt werden mit Lauge die Ester in Freiheit gesetzt.

Auch bei der Salzsäure wird die Hydrolyse bei relativ hoher Säurekonzentration und Siedetemperatur durchgeführt. Meist kommt eine 20 %ige Säure zur Anwen-

dung [4,12,23,28].

Wird die Hydrolyse eines Eiweisses im Autoklaven bei 180° während 3 bis 6 Stunden mit 1 %iger Salzsäure durchgeführt, so können aus dem Hydrolysat hauptsächlich Anhydride neben relativ wenig Aminosäuren isoliert werden[29].

Sowohl die Schwefelsäure als auch die Salzsäure verfärben das Hydrolysat bei diesem Eingriff, und es bilden sich die heute noch undefinierten Huminsubstanzen. Es sind tiefgefärbte Stoffe, die 2 bis 3 Prozent des Ansatzes ausmachen [12]. Von den verschiedenen Aminosäuren ist es vor allem das Tryptophan, welches unter Bildung von Humin zerstört wird [25,28]. Trotz der geringen Huminbildung wird auch heute noch die konzentrierte Salzsäure zur Zerlegung der Proteine verwendet. Die Huminbildung fällt im Vergleich zu den grossen Verlusten bei der Zerlegung des Aminosäurengemisches nicht stark ins Gewicht [12].

Die Iodwasserstoffsäure kommt wegen Nebenreaktionen kaum in Frage [30].

Nach Cherbuliez bietet ein Abbau mit Flusssäure keinen Vorteil gegenüber Salzsäure [31].

Verdünnte Salpetersäure (13,4 %) löst Casein bei 70° unter Bildung von Stickoxyden zu einer gelben Flüssigkeit, welche viel Oxalsäure enthält [32]. Wird Casein in der Kälte mit 20 %iger Salpetersäure behandelt, so bildet sich ein gelber Körper, in welchem Nitrogruppen nachgewiesen werden können [33].

Wird Casein mit der 40-fachen Menge 2,5 n Phosphorsäure im Autoklaven während zwei Stunden bei 127° be-

handelt, so ist das Casein nicht vollständig gespalten[34] Mit 1 %iger Phosphorsäure im zehnfachen Ueberschuss wurden nach Erhitzen im Autoklaven während 3 Stunden bei 180° 24 Prozente Anhydride gefunden [35].

Nasset stellte fest, dass die Hydrolyse eines Proteins von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig ist [34]. Casein wird nämlich in gleichen Zeiten von 2,5 n Schwefelsäure zu 80,5 Prozenten und von 2,5 n Phosphorsäure nur zu 35 Prozenten hydrolysiert. Diese Beobachtung gibt einen Hinweis auf die mässig spaltende Wirkung der organischen Säuren:

Verdünnte organische Säuren bringen Casein nur zur Quellung [36]. Ameisensäure löst Casein, nicht aber Essigsäure [37]. Die 50 %ige Essigsäure baut auch in der Hitze Gelatine nicht ab. Im Autoklaven bei 180° kann mit 10 %iger Essigsäure keine abiurete Spaltung von Gelatine erreicht werden [38]. Zehnprozentige Ameisensäure verhält sich gleich. Auch bei Anwendung von Kohlensäure oder Oxalsäure ist die Reaktion keine einfache Hydrolyse [39].

Essigsäureanhydrid acetyliert Aminosäuren und bewirkt deren Racemisierung [40].

Untersucht wurden auch verschiedene Säuregemische:

Essigsäure-Salzsäuregemisch löst Casein in kurzer Zeit mit tiefvioletter Farbe auf. Essigsäure-Schwefelsäuregemisch löst nur langsam, allerdings nur unter geringer Verfärbung [41].

2. Die Basen

Seit E. Fischer [4] werden die Basen kaum mehr zur Hydrolyse angewandt. Die Reaktion ist träger als mit starken Säuren. Da die entstehenden Aminosäuren ferner durch Laugen racemisiert werden, geht eines ihrer wesentlichen konstitutionellen Merkmale verloren [42]. Ueberdies entstehen Nebenprodukte wie Indol [43], Acetaldehyd [44] und sehr viel Ammoniak [45,46]. Aminosäuren, welche während 25 Stunden mit 20 %iger Natronlauge erhitzt wurden, spalteten Kohlendioxyd ab [47]. Die Hydrolysate sind fast farblos [48]. Die Spaltung ist natürlich auch im Autoklaven durchführbar [49].

Bei einer Behandlung von Eiweiss mit 5 %iger Ammoncarbonatlösung während 2 bis 6 Stunden im Autoklaven bei 180° entstanden neben Leucin vorwiegend Peptone [50]. Der Abbau ist damit kein vollständiger.

3. Andere Stoffe

Am einfachsten scheint die Hydrolyse mit Wasser zu sein. Sie kann in intensiverer Form im Autoklaven ausgeführt werden. Das Eiweiss wird aber nur wenig abgebaut [51], und unter den Spaltprodukten befindet sich Leucinanhydrid [52].

Ebenfalls wurde ein Abbau der Eiweisse mit organischen Stoffen wie Alkohole und Säureamide untersucht:

Bei einer Erhitzung mit Methyl- oder Aethylalko-

hol während zehn Stunden bei 180° ging der Abbau bis zur Bildung von einigen Diketopiperazinen. Dabei entstanden bis 24 Prozente des Gesamtstickstoffs leicht flüchtige Stickstoffverbindungen (53).

Mit wasserfreiem Glycerin gelang es Casein bei 180° nach drei Stunden bis zu den Peptonen abzubauen (54). Jirgensons hat festgestellt, dass nach zwei Stunden bei 140° die Spaltstücke des Caseins ein Molekulargewicht von 1000 bis 2000 aufweisen (55).

Wird Casein mit Acetamid bei 150° behandelt, so geht es in Lösung. Dabei tritt eine Spaltung (désagrégation) ein, und die Spaltstücke haben ein Molekulargewicht zwischen 250 und 400 (56).

Casein kann in alkalischem Medium mit Dimethylsulfat zu einer rein weissen Verbindung methyliert werden (57).

4. Die Fermente

Auch Fermente bauen Eiweisskörper ab. Der Abbau erfolgt etappenweise und erlaubt die Konstitution einfacher Eiweisse aufzuklären. So gibt Waldschmidt-Leitz auf Grund derartiger Spaltungen eine Konstitutionsformel für Clupein an (58). Felix und Mager machen aber einen andern Konstitutionsvorschlag, wobei sie sich auf analoge Methoden stützen (59).

Nur die einfachsten Eiweisskörper, wie zum Beispiel die Protamine werden von den Fermenten ganz abgebaut. Komplizierte Eiweisskörper, wie das Casein (Proteide)

werden nicht vollständig in die Bausteine zerlegt [60,61].

Da bei der vorliegenden Problemstellung eine vollständige Hydrolyse erforderlich war, wurde die Spaltung mit starken Mineralsäuren verwendet.

B. Eigene Versuche

Angesichts der Tatsache, dass die Hydrolyse der Eiweissstoffe noch mit keinem Reagens ganz befriedigend gelingt, und kleine Aenderungen der Konzentration und der Reaktionstemperatur grossen Einfluss auf die Produkte haben, wurden zur Ergänzung der in der Literatur anzutreffenden Beobachtungen noch einige weitere, eigene Versuche angestellt. Diese sind im folgenden kurz beschrieben.

Die Ansätze hatten ferner den Sinn, uns mit schon bekannten Erscheinungen vertraut zu machen. Untersucht wurden wiederum:

1. Säuren
2. Basen
3. Andere Stoffe

Zuerst wurden drei Versuchsreihen mit Schwefelsäure angesetzt:

In einer ersten Versuchsreihe wurden je 0,6 g Casein mit je 15 ccm Schwefelsäure-Wassermischung verschiedener Konzentrationen bei Zimmertemperatur aufbewahrt und von Zeit zu Zeit durchgerührt. Die Tabelle gibt über

die Erscheinungen Aufschluss:

Tab.2: Veränderung von Casein in Schwefelsäure versch. Konz.

Konzentration der Säure in Prozenten	Auflösungsgeschwindigkeit	Auftreten der Verfärbung
20 und 30	in 14 Monaten ungelöst	in 14 Tagen gelblich 3 Monaten gelbbraun 7 Monaten braun 12 Monaten schwarzbraun 14 Monaten schwarz
40	in 7 Monaten z.Teil gelöst in 14 Monaten fast gelöst	in 6 Tagen gelblich 14 Tagen bräunlich 3 Monaten braun 7 Monaten violettbraun 14 Monaten schwarz
50	in 4 Stunden z.Teil gelöst in 24 Stunden gelöst	in 4 Tagen gelblich 8 Tagen gelbbraun 3 Monaten dunkelbraun 7 Monaten violettschwarz 12 Monaten schwarz
60	in 24 Stunden gelöst	in 2 Stunden gelblich 4 Tagen gelbbraun 3 Monaten strohbraun 12 Monaten schwarzbraun
70	in 4 Tagen gelöst	in 2 Stunden gelb 24 Stunden gelbbraun 4 Tagen braun 8 Tagen dunkelbraun 4 Monaten schwarzbraun 7 Monaten schwarz
80	in 14 Tagen gelöst	in 1 Stunde gelb 11 Stunden dunkelbraun 4 Monaten schwarzbraun 7 Monaten schwarz

Ergebnis:

Die 50 %ige Schwefelsäure hat besonders günstige Eigenschaften. Die Auflösung erfolgt verhältnismässig rasch, und die Verfärbung tritt nur langsam ein. Bei höhern Konzentrationen tritt die Lösung zwar auch noch rasch ein, aber die Verfärbung ist viel intensiver.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Mengenverhältnis von Casein zu 50 %iger Schwefelsäure variiert. Es wurden je 20 g Casein mit 12,5 25, 50 und 100 ccm Schwefelsäure übergossen.

Mengen bis 50 ccm brachten das Casein nur zur Quellung, und die entstandene, mehr oder weniger steife Gallerte veränderte sich nicht. Erst in der fünffachen Menge Säure trat Verflüssigung ein.

In einer dritten Versuchsreihe wurde der Abbau zeitlich verfolgt:

50 g Casein wurden mit 500 ccm 50 %iger Schwefelsäure bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach einem Tag war vollständige Lösung eingetreten. Es wurden nunmehr die Aequivalentgewichte laufend bestimmt. Hiezu wurden je 10 ccm abpipettiert und in einen kleinen Erlenmeyerkolben gebracht. Die Schwefelsäure wurde mit einer einge-

wogenen Menge reinstem, wasserfreiem Natriumcarbonat neutralisiert. Um die entstehende Kohlensäure auszutreiben, wurde am Schluss rasch auf dem Wasserbad erhitzt und etwas Wasser zugegeben, damit alles Natriumsulfat in Lösung ging. Anschliessend wurde mit n/5 Barytlauge genau auf p_H 4 neutralisiert. (Tüpfeln auf Kongorotpapier). Dazu wurden 3 bis 3,5 ccm Lauge verbraucht.

Die nun bei der Hydrolyse frei gewordenen Aminosäuren wurden nach der Methode von Sörensen (62) bestimmt. Durch Zugeben von 10 ccm neutralisiertem, konzentriertem Formaldehyd bildeten sich den Schiff'schen Basen (63) analoge Verbindungen, die nun direkt mit Lauge titriert werden konnten. Als Indikator diente jetzt Phenolphtalein. Aus den verbrauchten ccm Lauge konnte das jeweilige Aequivalentgewicht berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengestellt und auf einer Kurve graphisch aufgezeichnet (Fig. 1). Als Anfangswert wurde der von Pertzoff bestimmte Wert von rund 2000 eingesetzt (64).

Um das Endaequivalentgewicht zu erhalten, wurde der Abbau bei einer kleinen Probe durch 18 stündiges Erhitzen vervollständigt. Es ergab sich hiebei der Wert 107,5.

Tabelle 3: Aequivalentgewicht beim Abbau des Caseins mit 50 %iger Schwefelsäure bei Zimmertemp.

Tage	Aequivalentgewicht	Tage	Aequivalentgewicht
5	633	16	322
6	505	22	260
7	480	71	187
8	413	99	169
9	356	210	141
10	380	386	120
12	360	∞	107,5

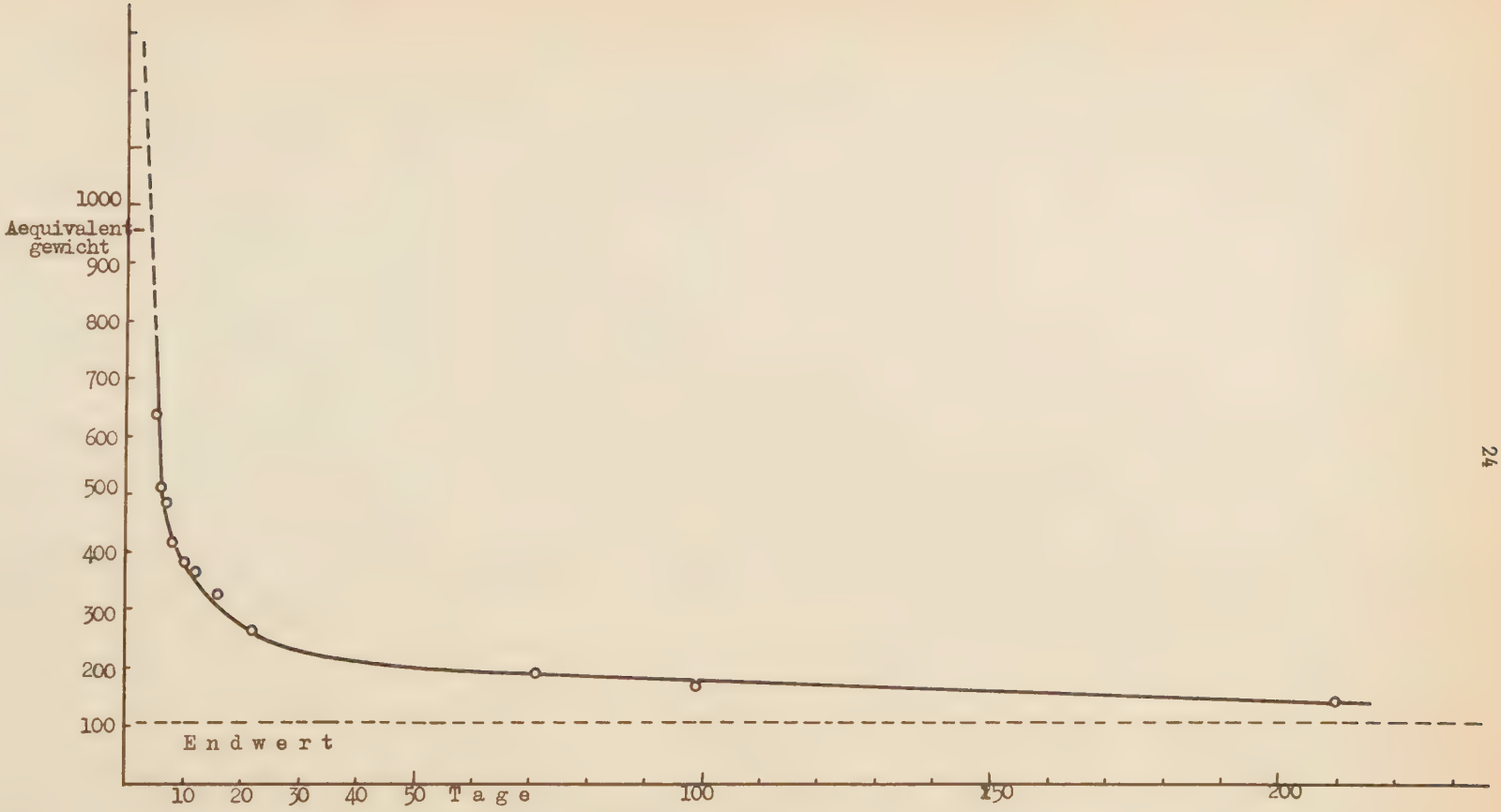


Fig. 1 Aequivalentgewichte beim Abbau des Caseins mit 50 %iger Schwefelsäure

Der Abbau geht also sehr langsam vor sich, denn nach einem Jahr ist die Hydrolyse noch nicht ganz zu Ende. In dieser Zeit hat sich aber das Hydrolysat weitgehend verfärbt.

Für die Gegenwart höherer Peptide gibt es einen einfachen qualitativen Test. Solange noch höhere Peptide vorhanden sind, tritt bei der mit der Neutralisation verknüpften Kohlensäureentwicklung starkes Schäumen ein. Wenn das durchschnittliche Aequivalentgewicht auf 200 gesunken ist, hört die Bildung eines stabilen Schaumes ganz auf.

Im weitern wurden noch einige Hydrolyseversuche mit verschiedenen Reagenzien angesetzt. Ueber die Ergebnisse orientiert folgende Tabelle:
(Das Verhältnis Casein : Reagens wurde stets 1 : 5 gewählt)

Tab. 4: Einwirkung verschiedener Reagenzien auf Casein

Hydrolysierendes Reagens	Beobachtungen
50 %ige Phosphorsäure bei Zimmertemperatur:	Nach 10 Stunden milchige Flüssigkeit, erstarrt allmählich unter Verfärben zu einer Gallerte. Keine Verflüssigung nach langer Zeit
25 %ige Phosphorsäure bei Siedetemperatur:	Quellung und Verflüssigung. Nach 30 Stunden Erhitzen schwarzes Hydrolysat mit 6,6 % Rückstand
Eisessig bei Zimmertemperatur:	Casein quillt zu einer körnigen Gallerte. Im Verlaufe von zwei Jahren keine Verflüssigung und Verfärbung

Hydrolysierendes Reagens	Beobachtungen
20 %ige Essigsäure bei Siedetemp:	Teilweise Verflüssigung nach 95 Stunden; Rückstand 31 %; Hydrolysat dunkelbraun
Essigsäure+Essigsäureanhydrid (1 : 1) versch. Temperaturen:	In der Kälte ohne Wirkung; nach 56 Stunden bei Siedetemperatur bleibt der Hauptanteil ungelöst; Rückstand 75 % des Caseins
Essigsäure-20 %iges Oleum (4:1) Zimmertemperatur:	Rasche Verflüssigung und Schwärzung des Reaktionsgemisches
10 %ige Natronlauge; Zimmertemp:	Quellung und spätere Verflüssigung; trübe, gelb
20 %ige Natronlauge; Zimmertemp:	Verflüssigung zu einer trüben viscösen Masse; viel Ammoniak; nach 3 Tagen Nadeln von Tyrosin; bei der Neutralisation nach 11 Tagen Rückstand von 8,6 % des Ansatzes
30 %ige Natronlauge; Zimmertemp:	Honigartige Masse, intensive Ammoniakentwicklung, Tyrosinabscheidung in kristalliner Form
40 und 50 %ige Natronlauge Zimmertemperatur:	Casein leichter als die entsprechende Lauge; reagiert nicht mit ihr
10 %ige Natronlauge; Siedetemp:	Verflüssigung zu einer goldgelben Lösung, grauer Rückstand entsprechend 4 % des Ansatzes
Dimethylsulfat Zimmertemperatur:	Zusammenbacken zu einer körnigen Masse; nach einem Jahr Verflüssigung und Schwärzung
Dimethylsulfat bei 90°:	Verflüssigung nach 16 Stunden, starke Schwefeldioxydentwicklung; Reaktionsgemisch schwarz und undefinierbar

C. Der Abbau einer grössern Menge Casein

Nachdem alle Versuche zeigten, dass eine vollständige Hydrolyse nur mit Reagenzien erreicht wird, die auch etwas Huminstoffe bilden, wurde auf die alte und bewährte Methode der Hydrolyse mit Schwefelsäure nach Abderhalden zurückgegriffen (65).

Ein Kilogramm Casein (lufttrocken) wurde mit der dreifachen Menge 25 %iger Schwefelsäure während 16 Stunden am Rückfluss erhitzt. Das gekühlte, schwarze, nach Fleischextrakt riechende Hydrolysat wurde mit einem Liter Wasser verdünnt. Die schlecht filtrierbaren Huminstoffe wurden aus 200 Kubikzentimeter auf einem Glasfilter gesammelt. Es blieben 0,822 g, oder 1,4 % des angesetzten Caseins.

Die Schwefelsäure wurde durch Ausfällen mit Bariumhydroxyd entfernt. Es wurde hiezu unter Rühren und Erwärmen auf 60° langsam eine heisse Lösung von zwei Kilogramm Bariumhydroxyd (krist.) in zwei Liter Wasser zugegeben. Hiebei wurde das p_H 3 erreicht. Bei diesem Säuregrad werden Aminosäuren noch wenig an den grossen Bariumsulfatniederschlag adsorbiert (66). Nachdem sich der Niederschlag gesetzt hatte, wurde die überstehende saure Lösung dekantiert. Der Bodenkörper (Bariumsulfat I) wurde in vier Liter Wasser bei 70° aufgeschlämmt. Nach

dem Absetzen des Bariumsulfates wurde die hellgelbe Lösung abgehebert und mit der Hauptlösung vereint. Der Sulfatniederschlag wurde auf eine Nutsche gebracht und möglichst von der verbliebenen Lösung befreit. Es bildeten sich 1480 g Sulfat mit 0,59 Prozent Stickstoff. Somit enthielt Bariumsulfat I 8,73 g Stickstoff, also 6,3 Prozent des Eiweissstickstoffs (67).

Aus der gesamten, klaren Lösung wurde mit Bariumhydroxyd weitere Schwefelsäure ausgefällt. Durch Zugabe von 200 g Bariumhydroxyd in 600 ccm Wasser wurde das p_H 4 erreicht. Schliesslich betrug es nach weitern 50 g Bariumhydroxyd 4,5. Der entstandene Bariumsulfatniederschlag II war viel feinkristalliner und weisser als die erste Fällung. Er konnte nur durch Dekantieren und anschliessendem Zentrifugieren von der Lösung getrennt werden. Wie erwartet, enthielt dieser Sulfatniederschlag prozentual mehr Stickstoff als der erste. Die 185 g enthielten 1,50 Prozent Stickstoff, oder 2,8 g Stickstoff, also noch 2,0 Prozent des Eiweissstickstoffs.

Das Hydrolysat wurde nun im Vacuum von 8,1 Liter auf 3,81 Liter konzentriert. Es enthielt dann in 100 ccm 20,32 g Aminosäuren, insgesamt also 774 Gramm.

Ausbeute:

Hammarsten Casein, welches bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 % aufgehoben wird, enthält 12,2 % Wasser (68). Somit enthielt die angewandte Caseinmenge 878 g wasserfreies Casein. Bei der Hydrolyse des Caseins wird eine gewisse Wassermenge chemisch gebunden. Diese Menge kann wie folgt berechnet werden:

Aus dem Aminosäurengehaltes des Caseins (15) berechnet sich das mittlere Molekulargewicht der Aminosäurenmischung zu 135. Wird von diesem Werte das gebundene Wasser (1 Mol d.h. 18) in Abzug gebracht, so wird das Molekulargewicht der Aminosäurenreste gleich 117. Nun entspricht das zu hydrolysierende Casein diesen Aminosäurenresten. Die Rechnung ergibt, dass aus 878 g Casein 1015 g Aminosäuren entstehen sollten. Die erhaltenen 774 g entsprachen also einer Ausbeute von 76,4 %.

Verluste:

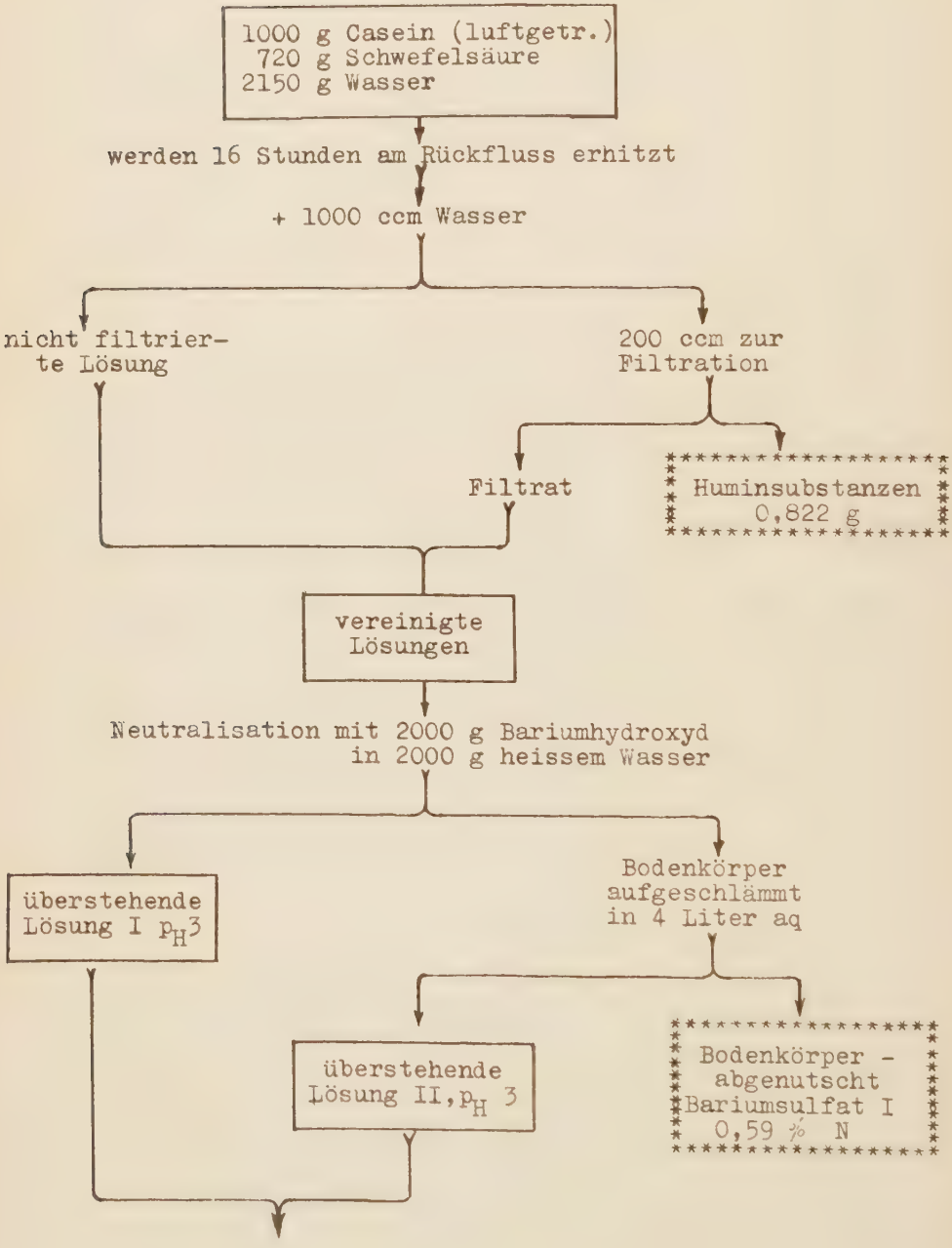
Ein Teil der Aminosäuren war am Bariumsulfatniederschlag adsorbiert. Beide Niederschläge enthielten zusammen 11,5 g Stickstoff.

Aus dem Aminosäurengemisch eines Caseinhydrolysates wurde der Stickstoffgehalt zu 13,10 Prozent ermittelt. Enthält das vom Niederschlag adsorbierte Material den Stickstoff im gleichen Verhältnis zu C, H und O wie ein Caseinhydrolysat, so entsprach dem adsorbierten Stickstoff eine Aminosäurenmenge von ca. 90 Gramm. Unter Mitberechnung dieser Menge erhöht sich die Ausbeute auf 85 %.

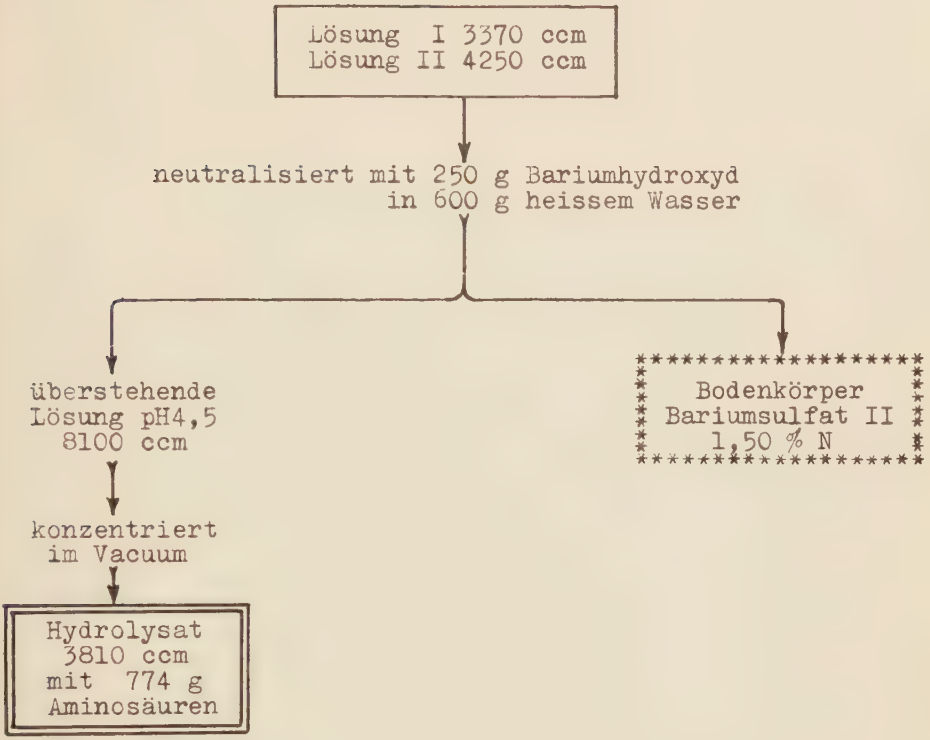
Ueber die Aufarbeitung des Hydrolysates gibt Tabelle 5 Aufschluss:

Tabelle 5

Hydrolyse des Caseins



(Tabelle 5)


Lösung I 3370 ccm
Lösung II 4250 ccm
neutralisiert mit 250 g Bariumhydroxyd
in 600 g heissem Wasser
überstehende
Lösung pH4,5
8100 ccm
konzentriert
im Vacuum
Hydrolysat
3810 ccm
mit 774 g
Aminosäuren
Bodenkörper
Bariumsulfat II
1,50 % N

III. Sterilisation des Hydrolysates

Es ist bekannt, dass Eiweisshydrolysate geeignete Nährböden für Mikroorganismen sind. Da nun die Dialyse bei Zimmertemperatur längere Zeit dauert, muss eine Entwicklung von Mikroorganismen verhindert werden. Es kommen folgende Möglichkeiten der Sterilisation in Frage:

1. Sterilisation des Dialysators durch Hitze
2. Sterilisation des Hydrolysates mit Gift

Es ist praktisch unmöglich, eine so umfangreiche und komplizierte Apparatur wie den Dialysator durch Hitze zu sterilisieren. Somit bleibt die Möglichkeit das zu dialysierende Substrat durch Gifte zu sterilisieren.

Die mit dem Dialyseprozess angestrebte Zielsetzung und die apparativen Eigenarten der Methode stellen an das zugegebene Gift folgende Bedingungen:

1. Es muss in grosser Verdünnung wirksam sein.
2. Es soll nicht mit dem Hydrolysat chemisch reagieren.
3. Es soll nicht mit Wasserdampf flüchtig sein.

4. Es soll nicht vom Substrat wegdialysieren.
5. Es soll auf einfache Weise quantitativ entfernt werden können.
6. Es soll gegen Gummi, Cellophan und Cellulose indifferent sein.

Die üblichen Desinfektionsmittel wie Kohlenwasserstoffe (besonders Toluol) und Phenole (Kresole und Thymol) scheiden wegen der Wasserdampfflüchtigkeit und wegen ihrer Adsorption in den Gummibestandteilen der Apparatur aus. Auch Quecksilberverbindungen kommen nicht in Frage, weil sie mit den Aminosäuren unlösliche Verbindungen eingehen. Die Kupferverbindungen der Aminosäuren stellen lösliche Salze dar, und es wurde deshalb geprüft, ob die bekannte Toxizität der Kupferionen auch hier zur Geltung kommt. Ferner schien von den Desinfektionsmitteln Formaldehyd geeignet zu sein. Sein Verhalten gegenüber Aminosäuren musste aber vorerst näher untersucht werden.

Somit ergaben sich zwei Versuchsreihen:

1. Prüfung der Kupfersalze der Aminosäuren auf Festigkeit gegen Mikroorganismen.

2. Untersuchung der Einwirkung von Formaldehyd auf Aminosäuren.

---

1. Die Kupfersalze

Es sollte geprüft werden, ob die Aminosäuren eines Eiweisshydrolysates in Form der Kupfersalze von Mikroorganismen nicht angegriffen werden. Ueber die Eigenschaften der Kupfersalze geht aus der Literatur folgendes hervor:

Die Aminosäuren bilden mit $Cu^{\cdot\cdot}$ genau definierte Salze. Die Zusammensetzung der einbasischen wie der zweibasischen Salze gehorcht den stöchiometrischen Gesetzen [69]. Der Kupfergehalt kann zur Identifizierung der Aminosäuren wertvolle Dienste leisten [4]. Die Kupfersalze zeichnen sich teils durch ihre Schwerlöslichkeit aus [70]:

Tabelle 6: Löslichkeit einiger Kupfersalze

Kupfersalz	Löslichkeit in Wasser bei	
	Zimmertemp:	Siedetemp:
Leucin	1 : 3045	1 : 1460
Asparaginsäure	1 : 2870	1 : 234
Glutaminsäure	1 : 3400	1 : 400
Tyrosin	1 : 1230	1 : 240

Ausgenützt wird die verschiedene Löslichkeit der Salze in Wasser und Methylalkohol bei der Trennung nach

Town (11,22).

Die meisten Kupfersalze drehen die Ebene des polarisierten Lichtes im gleichen Sinn wie die freien Aminosäuren (71).

Zur Darstellung der Kupfersalze wird eine wässrige Lösung von Aminosäuren mit einem Ueberschuss von Kupfercarbonat (22) oder Kupferoxyd (69) erhitzt. Dabei bilden sich die tiefblauen Kupfersalze.

Auf Toxizität wurde bisher nur Alaninkupfer untersucht (69). Die geringe Kupferionenkonzentration (72) genügt, um Infusorien in ihrer Bewegung stark zu schädigen.

Um das Verhalten eines Kupfersalzgemisches von Aminosäuren gegen Mikroorganismen zu untersuchen, wurde bei den eigenen Versuchen wie folgt verfahren:

Ein Caseinhydrolysat wurde in der Hitze mit überschüssigem Kupfercarbonat umgesetzt. Die tiefblaue heissfiltrierte Lösung schied beim Abkühlen etwas Kupfersalze aus.

Es wurden Lösungen der Kupfersalze in verschiedenen Verdünnungen in offenen Erlenmeyerkolben stehen gelassen und die Bildung von Mikroorganismen beobachtet.

Darüber gibt Tabelle 7 Aufschluss:

Tabelle 7

Sterilisierende Wirkung der Kupfersalze der Aminosäuren

Konzentration der Lösung an Kupfersalzen der Aminosäuren	Beobachtungen über die Entwicklung von Mikroorganismen
12,8 %	keine Mikroorganismen nach 120 Tagen
1,28 %	Wenig Mikroorganismen nach 80, ziemlich viele nach 120 Tagen
0,13 %	Wenig Mikroorganismen nach 50, ziemlich viele nach 80 Tagen
0,01 %	Wenig Mikroorganismen nach 30, ziemlich viele nach 60 Tagen

Man erkennt, dass nur bei hoher Konzentration Sterilität vorhanden ist. Da es nicht möglich ist, im Dialysator so hohe Konzentrationen aufrecht zu erhalten, kommt aber eine Verwendung der Kupfersalze nicht in Frage.

2. Formaldehyd als Desinfektionsmittel

a) Literatur:

Es ist bekannt, dass die Aminogruppe der Aminosäuren mit Formaldehyd unter Bildung von Methinverbindungen, den Schiff'schen Basen reagieren [63]. Die Reaktion führt zu einem Gleichgewicht:

$$R\text{-}\underset{\underset{COOH}{|}}{CH}\text{-}NH_2 + OCH_2 \rightleftharpoons R\text{-}\underset{\underset{COOH}{|}}{CH}\text{-}N{=}CH_2 + H_2O$$

Daraus berechnet sich die Gleichgewichtskonstante:

$$\frac{(\text{Aminosäure})\cdot(\text{Formaldehyd})}{(\text{Methinverbindung})} = \text{konstant.}$$

Die nach Svehla [73] und Baur [74] bestimmten Gleichgewichtskonstanten sind folgende:

Tabelle 8

Gleichgewichtskonstanten einiger Aminosäuren mit Formaldehyd	
Glykokoll	1,73
	1,33
Alanin	16,7
	14,1
Valin	28,9
Leucin	36,8
Asparaginsäure	25,7
Glutaminsäure	30,7

Die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung wurde beim Glykokoll aus Leitfähigkeitsbestimmungen ermittelt [75]. Während hier das Gleichgewicht nach zehn Minuten erreicht ist, scheint die Reaktionsgeschwindigkeit bei andern Aminosäuren geringer zu sein. Diesbezügliche Versuche wurden von Holden und Freeman ausgeführt [76].

Diese Autoren bestimmten mit salpetriger Säure den Aminostickstoff nach van Slyke [77] sowohl bei freien Aminosäuren, als auch bei Formaldehyd-Aminosäurengemischen.

Die Aminosäurenlösungen und die Aminosäuren-Formaldehydlösungen wurden bei 37° unter Zusatz von Toluol aufgehoben und von Zeit zu Zeit nach van Slyke untersucht.

Beim Histidin war schon nach etwa einem Tag nur noch 1/20 des Aminostickstoffs nachweisbar.

Beim Lysin wurde nach einem Tag noch die Hälfte, nach 30 Tagen noch ca. 1/4 des Aminostickstoffs gefunden.

Andere Aminosäuren wie Alanin, Glykokoll, Glutaminsäure und Tyrosin geben durch den Formaldehyd keinen Abfall des Aminostickstoffs, wenn die Mischung mit Formaldehyd sauer oder neutral ist. Im alkalischen Medium fällt der van Slyke-Stickstoff mit der Zeit ebenfalls ab.

Eingehender waren die Versuche von Wadsworth und Pangborn [78]:

Diese Autoren bestimmten in einem Aminosäure-Formaldehydgemisch nicht den Aminostickstoff, sondern den Formaldehyd, der sich nach verschiedenen Zeiten noch nachweisen liess. Dabei gingen sie folgendermassen vor:

Aequivalente Mengen Formaldehyd und Aminosäuren

wurden in einem Phosphatpuffer von p_H 7,8 gebracht. Die Reaktionsgemische wurden unter Zusatz von Toluol bei 39° aufgehoben. Nach gewissen Zeiten wurden Proben entnommen und mit Dimethyldihydroresorcinol versetzt und 4 Stunden stehen gelassen. Es wurde angenommen, dass auf diese Weise der freie Formaldehyd erfasst wurde. In andern Proben wurde das Fällungsmittel während 3 Tagen einwirken gelassen. Auf diese Weise konnte neben dem freien auch der durch Dissoziation der Methinverbindung wieder in Freiheit gesetzte Formaldehyd erfasst werden. Dieser wird von den Autoren als „reversibel" gebundener Formaldehyd bezeichnet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt:

Tabelle 9

Bestimmungen des Formaldehyds
aus Aminosäure-Formaldehydgemischen
(mg H_2CO/100 ccm Lösung)

Aminosäure	Zeit der Einwirkung	freier Formaldehyd	freier + reversibel gebundener Formaldehyd
Histidin	Beginn	132,0	
	2 Stunden	119,0	
	24 Stunden	94,5	95,5
	4 Tage	62,6	62,3
	7 Tage	33,5	32,5
	14 Tage	15,5	15,6
	21 Tage	11,8	12,1

Aminosäure	Zeit der Einwirkung	freier Formaldehyd	freier + reversibel gebundener Formaldehyd
Lysin	Beginn	142,0	165,0
	2 Stunden	140,0	165,0
	24 Stunden	115,0	139,0
	7 Tage	69,5	97,0
	14 Tage	44,8	69,4
	21 Tage	35,9	53,0
	28 Tage	28,7	44,7
Glykokoll	Beginn	144,0	
	2 Stunden	136,0	144,0
	4 Tage	129,4	141,0
	11 Tage	119,0	137,0
	17 Tage	112,0	129,0
	28 Tage	108,0	122,0
Alanin	Beginn	143,7	
	4 Tage	133,0	139,7
	17 Tage	111,0	123,0
	28 Tage	105,0	11o,0
Arginin	Beginn	138,0	148,0
	2 Stunden	76,0	148,0
	24 Stunden	52,0	144,0
	4 Tage	35,0	147,0
	11 Tage	34,3	147,0

Bei allen Aminosäuren nimmt die Menge des „freien" Formaldehyds mit der Zeit stark ab, als Zeichen, dass eine Reaktion mit den Aminosäuren in beträchtlichem Ausmass stattgefunden hat.

Nur beim Histidin ist zu allen Zeiten die Menge „freier" Formaldehyd gleich gross wie die Menge „freier +

gebundener" . Bei dieser Aminosäure wird also aller Formaldehyd so verbraucht, dass er hydrolytisch nicht mehr in Freiheit gesetzt werden kann.

Bei Lysin, Glykokoll und Alanin wird ein Teil des verbrauchten Formaldehyds durch Hydrolyse wieder frei.

Beim Arginin allein lässt sich die gesamte Aldehydmenge abspalten und wieder nachweisen.

Besonderes Interesse bietet die in den zuletzt erwähnten Versuchen behandelte Spaltung der Methinverbindungen. Diese Spaltungsmöglichkeit war für die hier auszuführenden Untersuchungen wichtig, weil das Desinfektionsmittel vor der weitern Verarbeitung der Dialysatfraktionen quantitativ entfernt werden sollte.

Versuche von Nitschmann (79,80) ergaben, dass mit Formaldehyd gegerbte Caseine nur durch Destillation unter Zusatz von Phosphorsäure den Aldehyd quantitativ wieder abgeben. Bei der Destillation über Schwefelsäure konnte infolge Hydrolyse des Eiweisses nie aller Formaldehyd erfasst werden. Welches in diesem Fall die Veränderung des Formaldehyds ist, ist bis heute unbekannt.

Methylenaminosäuren und deren Salze können unter Zusatz von 50 %iger Phosphorsäure durch Wasserdampfdestillation vollständig in die Komponenten zerlegt werden (81). Tabelle 10 gibt über die Beobachtungen Aufschluss:

Tabelle 10

Die Zerlegung der Methylenaminosäuren durch Wasserdampfdestillation über 50 %iger Phosphorsäure

Verbindung	Formaldehyd in Prozenten	
	gef. im Destillat	berechnet
Methylenglycin	13,96	34,40
Bariumsalz	15,32	15,72
Calciumsalz	21,80	21,11
Kupfersalz	22,62	22,08
Methylenalanin	15,95	29,69
Bariumsalz	14,28	14,65
Calciumsalz	21,45	21,72
Kupfersalz	20,52	20,02
Methylenphenylalanin	13,54	14,08
Bariumsalz	12,07	11,81
Kupfersalz	13,69	13,28
Methylenasparagin		
Bariumsalz	12,56	12,56
Calciumsalz	15,38	15,06

Es zeigt sich also, dass die Methylenaminosäuren und deren Salze vollständig in die Komponenten zerlegt werden können.

b) Versuche:

Zuerst sollte geprüft werden, wie hoch die Formaldehydkonzentration bei einer reinen Aminosäurelösung und in einem Caseinhydrolysat sein muss, damit sich über längere Zeit keine Mikroorganismen entwickeln.

Hiezu wurden Lösungen von Aminosäuren mit Formaldehyd verschiedener Konzentrationen in offenen Erlenmeyerkolben bei 30° , bzw. Zimmertemperatur stehen gelassen. Ueber die Beobachtungen orientieren Tabellen 11 bis 13:

Tabelle 11

Sterilisierende Wirkung des Formaldehyds in 5 %iger Glykokollösung bei 30° C

Konzentration der Lösung an Formaldehyd	Beobachtungen über die Entwicklung von Mikroorganismen
0,00 %	Wenig Mikroorganismen nach 5, ziemlich viele nach 10, sehr viele nach 30 Tagen
0,04 % 0,37 % 3,45 %	Nach 30 Tagen noch keine Bildung von Mikroorganismen

Tabelle 12

Sterilisierende Wirkung des Formaldehyds in 8 %igem Caseinhydrolysat bei 18°

Konzentration der Lösung an Formaldehyd	Beobachtungen über die Entwicklung von Mikroorganismen
0,00 %	Wenig Mikroorganismen nach 5, ziemlich viele nach 8, sehr viele nach 11 Tagen
0,02 %	Wenig Mikroorganismen nach 10, ziemlich viele nach 15, sehr viele nach 30 Tagen
0,04 %	Wenig Mikroorganismen nach 20, ziemlich viele nach 30 Tagen
0,37 % 3,45 %	Nach 60 Tagen noch keine Entwicklung von Mikroorganismen

Tabelle 13

Sterilisierende Wirkung des Formaldehyds in 4,7 %igem Caseinhydrolysat bei 18°

Konzentration der Lösung an Formaldehyd	Beobachtungen über die Entwicklung von Mikroorganismen
0,00 %	Wenig Mikroorganismen nach 5, ziemlich viele nach 10, sehr viele nach 20 Tagen
0,025 %	Wenig Mikroorganismen nach 15, ziemlich viele nach 25 Tagen
0,05 %	Nach 100 Tagen viele Mikroorg.
0,10 % 0,20 %	Nach 100 Tagen noch keine Entwicklung von Mikroorganismen

Ein Vergleich von Tabelle 11 mit 12 und 13 zeigt, dass die Glykokollösung durch geringere Formaldehydkonzentrationen steril gehalten wird, als die Caseinhydrolysatlösung. Für Caseinhydrolysate kann eine Formaldehydkonzentration von 0,1 % als zureichend für die Sterilisation betrachtet werden.

Es wurde nun geprüft, ob der zugesetzte Formaldehyd wieder quantitativ entfernt werden konnte.

Zuerst wurde durch eine mit Formaldehyd sterilisierte Aminosäurelösung Wasserdampf geleitet und geprüft, wie rasch der Aldehyd überdestilliert. Auf einen Säurezusatz (Phosphorsäure) wurde verzichtet, da diese bei der Aufarbeitung der Aminosäuren entfernt werden müsste.

Der im Destillat vorhandene Formaldehyd wurde nach der Methode von Clausen [79] titrimetrisch bestimmt.

Die Wasserdampfdestillation wurde unter gewöhnlichem Druck ausgeführt.

1. Versuch mit Glykokoll

50 ccm einer 5 %igen Glykokollösung wurden mit 1 ccm einer Formaldehydlösung versetzt, die im ccm 10,16 mg Formaldehyd enthielt. Mehrere derartige Ansätze wurden verschieden lang stehen gelassen, nämlich 3 Stunden, 16 Stunden und 5 Tage. Hierauf erfolgte Wasserdampfdestillation mit

Formaldehydtitration im Destillat.

Bei der Destillation wurde insbesondere darauf geachtet, wie rasch der Formaldehyd mit dem Wasserdampf übertritt. Es zeigte sich beim ersten Ansatz, dass in 240 ccm Destillat so gut wie aller Aldehyd vorhanden ist, nämlich 10,18 mg. In weiteren 240 ccm Destillat waren nur noch 0,03 mg Formaldehyd vorhanden.

Der dritte Ansatz, (Dauer der Einwirkung 5 Tage) wurde so destilliert, dass eine grössere Zahl kleiner Destillate von ca. 30 - 40 ccm aufgefangen und gesondert auf Formaldehyd untersucht wurden. Es zeigte sich, dass am Anfang viel Aldehyd übergeht, dass dann aber gegen das Ende ein langsames Abklingen vorhanden ist, sodass für das quantitative Uebertreten doch recht grosse Quantitäten von Wasserdampf nötig sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

Tabelle 14

Wasserdampfdestillation des Formaldehyds aus einem Glykokoll-Formaldehydgemisch

Dauer der Einwirkung von Formaldehyd auf Glykokoll	Fraktionen		mg Formaldehyd in der Fraktion
	Nr.	ccm	
3 Stunden	1	240	10,18
	2	240	0,03
16 Stunden	1	240	10,17
5 Tage	1	27,5	5,18
	2	38,0	3,10
	3	28,0	0,93
	4	39,6	0,63
	5	40,0	0,28
	6	37,0	0,14

Man sieht, dass in allen Fällen der zugesetzte Formaldehyd durch Wasserdampfdestillation quantitativ entfernt werden kann.

Anschliessend wurden analoge Bestimmungen mit Caseinhydrolysat durchgeführt.

2. Versuch mit Caseinhydrolysat

50 ccm eines 4,7 %igen Caseinhydrolysates wurden mit 1 ccm einer Formaldehydlösung versetzt, die im ccm 10,16 mg Formaldehyd enthielt.

Nach 12 Stunden wurde das Gemisch der Wasserdampfdestillation unterworfen. Auch hier wurde eine grössere Anzahl kleiner Destillate von ca. 30 - 40 ccm aufgefangen und gesondert auf Formaldehyd untersucht.

Das Ergebnis ist in Tabelle 15 zusammengestellt:

Tabelle 15

Wasserdampfdestillation des Formaldehyds aus einem Hydrolysat - Formaldehydgemisch

Dauer der Einwirkung von Formaldehyd auf Hydrolysat	Fraktionen		mg Formaldehyd in der Fraktion
	Nr.	ccm	
12 Stunden	1	48,4	5,46
	2	45,7	1,31
	3	45,2	0,54
	4	43,3	0,18
	5	45,2	0,11
	6	83,5	0,18

Es trat hier ein merklicher Formaldehydverlust von 2,38 mg ein, da in 311 ccm Destillat statt der zugegebenen 10,16 mg deren 7,78 mg gefunden wurden.

Die Ergebnisse aus den zwei Versuchen (Glykokoll und Caseinhydrolysat) sind in Fig. 2 in Kurven wiedergegeben. Die überdestillierte Formaldehydmenge ist in Abhängigkeit der Destillatmenge aufgetragen.

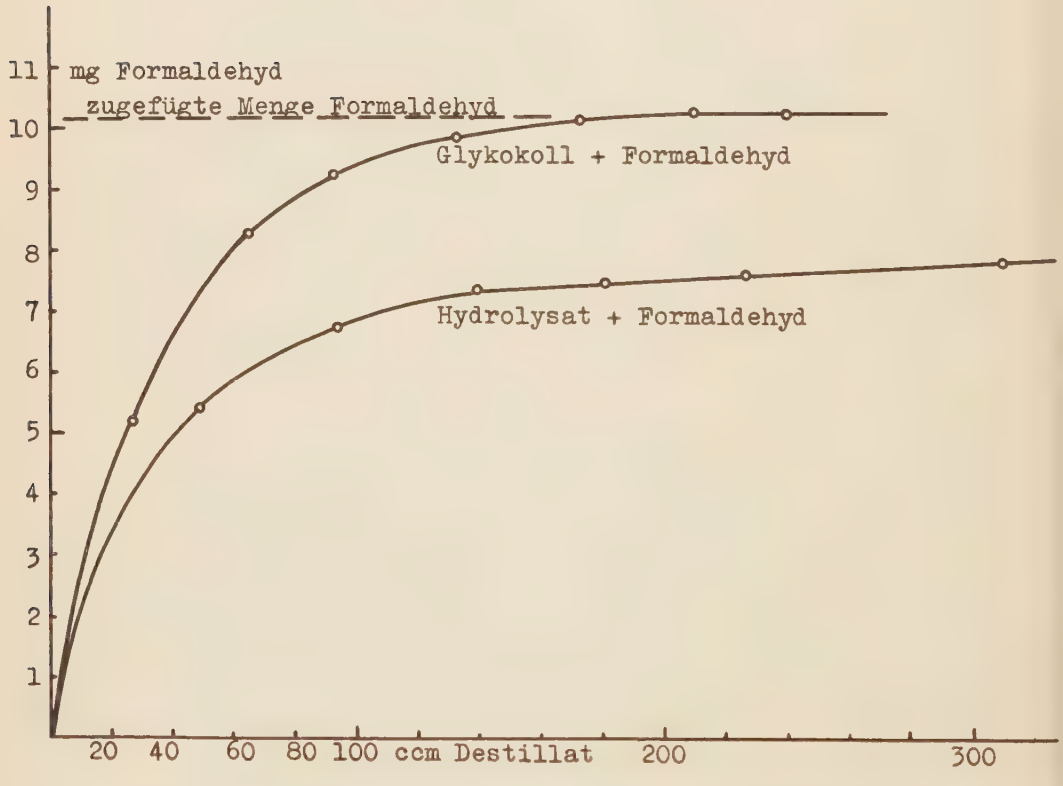


Fig. 2 Wasserdampfdestillation von Formaldehyd-Glykokoll- und Formaldehyd-Caseinhydrolysatgemisch: Im Destillat nachweisbarer Formaldehyd

Es ist aus den Kurven ersichtlich, dass bei Glykokoll der Formaldehyd in ca. 200 ccm Destillat übergeht, während beim Caseinhydrolysat in dieser Menge Destillat erst 75 Prozent anzutreffen sind.

In einer dritten Versuchsreihe wurde die aus einem Caseinhydrolysat destillierbare Formaldehydmenge über längere Zeit verfolgt.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde auch geprüft, ob Zusätze von Schwefelsäure oder Phosphorsäure die Freisetzung des Formaldehyds begünstigen.

Es wurde wie folgt verfahren:

Es wurde ein Gemisch von 190 ccm 4,7 %iges Caseinhydrolysat mit 10 ccm Formaldehydlösung versetzt, die 101,6 mg Formaldehyd enthielt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben von je 25 ccm untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 angegeben:

Tabelle 16

Destillierbare Formaldehydmenge aus einem Hydrolysat-Formaldehydgemisch nach verschiedenen Zeiten bei Anwendung verschiedener Methoden

Dauer der Einwirkung	Methode der Destillation	Fraktionen Nr.	Fraktionen ccm	mg Formaldehyd in der Fraktion
zugesetzte Menge Formaldehyd in 25 ccm				12,66
1 Tag	Wasserdampfdestillation	1	47,3	8,96
		2	58,1	1,47
		3	51,7	0,23
		4	50,1	0,12
		5	60,8	0,12
		6	53,9	0,07
		1-6	321,9	10,97
4 Tage	Nach Lit.79 Wasserdampfdestillation unter Zusatz von 0,25 ccm n H_2SO_4	1	41,0	7,68
		2	50,7	1,75
		3	45,6	0,28
		4	45,8	0,14
		5	92,9	0,14
		1-5	276,0	9,99
6 Tage	Wasserdampfdestillation	1	47,6	7,52
		2	143,9	1,97
		1+2	191,5	9,49
11 Tage	Wasserdampfdestillation	1	31,9	5,85
		2	48,9	1,65
		3	41,0	0,27
		4	76,8	0,21
		1-4	198,6	7,98

(Tabelle 16)

Destillierbare Formaldehydmenge aus einem Hydrolysat-Formaldehydgemisch nach verschiedenen Zeiten bei Anwendung verschiedener Methoden

Dauer der Einwirkung	Methode der Destillation	Fraktionen Nr.	Fraktionen ccm	mg Formaldehyd in der Fraktion
111 Tage	Wasserdampf-destillation	1	34,1	2,25
		2	33,8	0,82
		3	86,1	0,41
		4	80,9	0,17
		1-4	234,9	3,65
176 Tage	Nach Lit.79 Destillation unter Zusatz von 25 ccm m H_3PO_4 +220 ccm Wasser	1	240,0	3,00
224 Tage	Nach Lit.81 Wasserdampf-destillation unter Zusatz von 10 ccm 50 %iger H_3PO_4	1	53,8	2,10
		2	70,0	0,62
		3	141,6	0,28
		4	76,2	0,10
		1-4	341,6	3,10

In Fig. 3 sind die Daten graphisch wiedergegeben. Die Mengen Formaldehyd, die nach bestimmten Reaktionszeiten in 350 ccm Destillat nachgewiesen wurden, sind durch Doppelkreise angedeutet. Diese Werte sind in Fig. 4 in Abhängigkeit der Reaktionszeit aufgetragen.

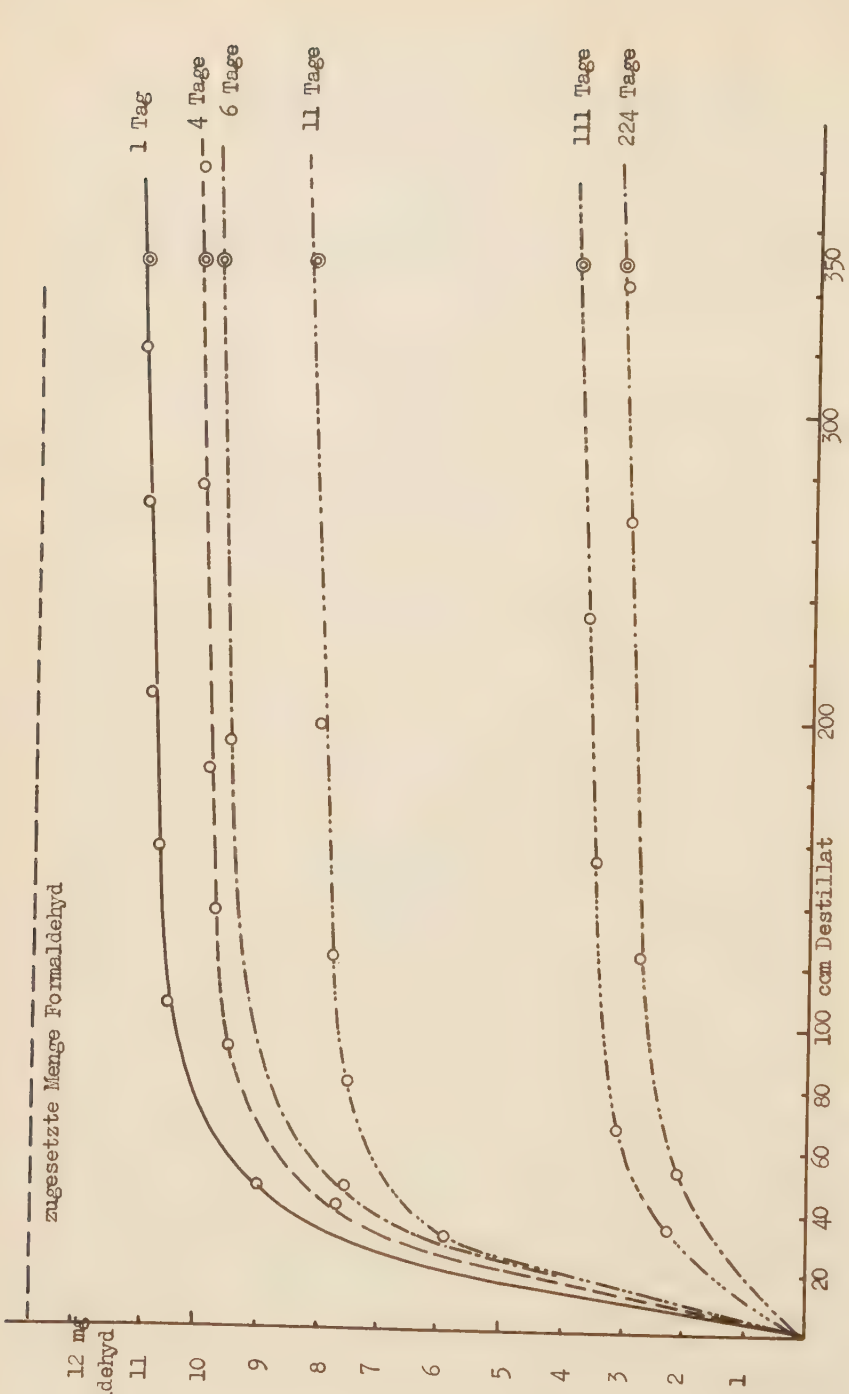


Fig. 3: Destillation von Formaldehyd aus Caseinhydrolysat-Formaldehydgemisch:
Nachgewiesene Menge Formaldehyd in Abhängigkeit der Destillatmenge

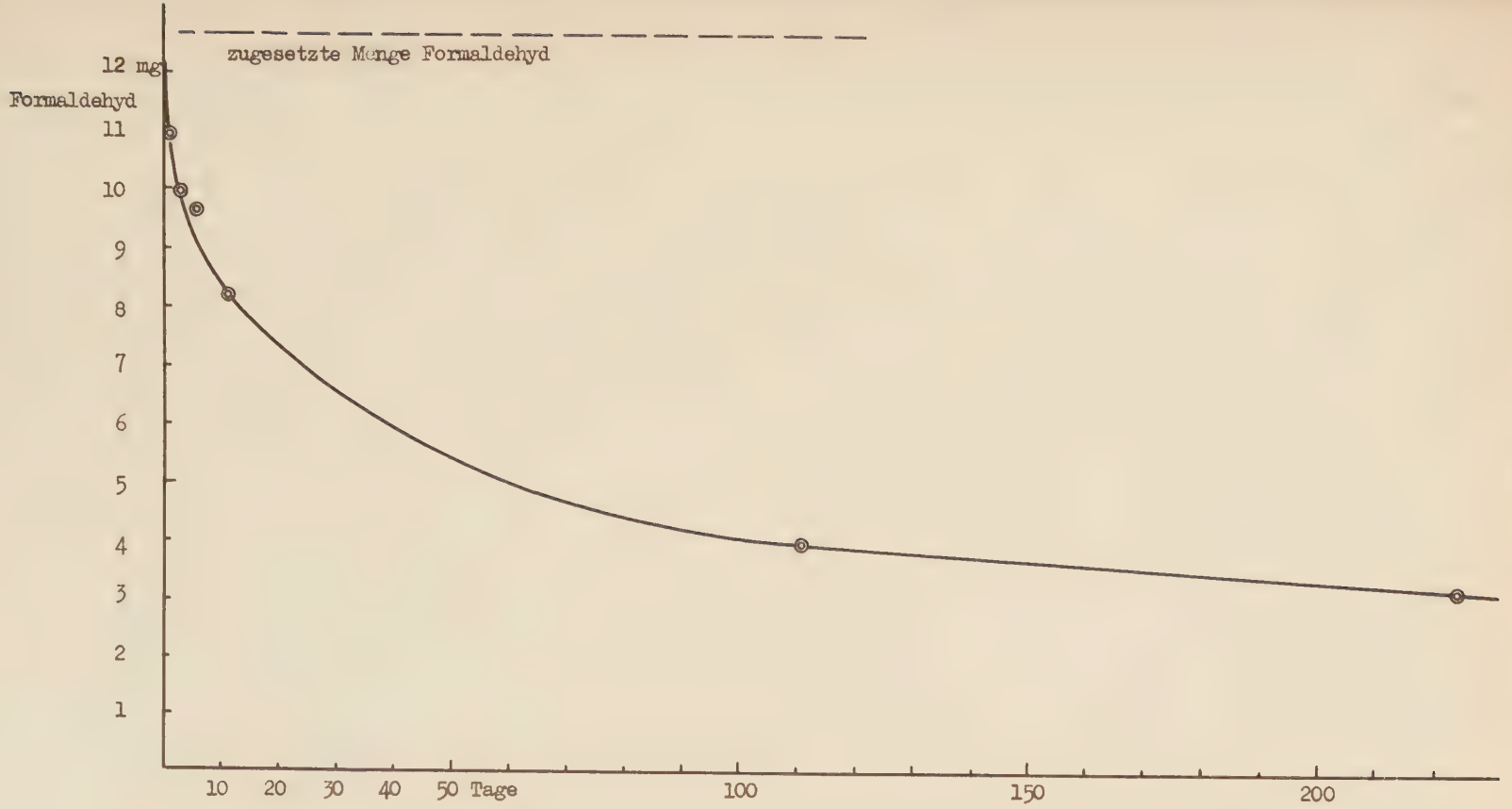


Fig. 4: Destillation von Formaldehyd aus Caseinhydrolysat-Formaldehydgemisch:
In 350 ccm Destillat nachgewiesene Menge Formaldehyd nach verschiedenen Reaktionszeiten (Cf. Fig. 3)

Aus den Kurven ist zu ersehen, dass die Zusätze von Säuren ohne Wirkung auf die Destillation des Formaldehyds sind. Die Kurven der Fig. 3 haben nämlich alle denselben Charakter, und in Fig. 4 liegen alle Punkte auf ein und derselben Kurve.

Die Versuchsreihe zeigt ferner, dass die Menge nicht mehr destillierbaren Formaldehyds mit der Zeit beständig zunimmt.

In einer vierten Versuchsreihe wurde geprüft, ob der nicht mehr destillierbare Formaldehyd den Trockenrückstand der Aminosäuremischung erhöhte. Dazu wurde wie folgt verfahren:

Ein Gemisch von 200 ccm Caseinhydrolysat mit 8,8610 g Aminosäuren und 10 ccm einer Formaldehydlösung mit 0,1016 g Formaldehyd wurde 86 Tage stehen gelassen. Die Mischung enthielt in 20 ccm 0,8439 g Aminosäuren und 0,0096 g Formaldehyd. Die 20 ccm wurden der Wasserdampfdestillation unterworfen und in 240 ccm Destillat 0,0007 g Formaldehyd nachgewiesen. Es waren also 0,0089 g Formaldehyd verbraucht worden. Um sicher zu sein, dass aller freie Formaldehyd abdestilliert wurde, wurden noch weitere 400 ccm Destillat aufgefangen. Der Destillationsrückstand wurde eingedunstet und bis zur Gewichtskonstanz im Hochvacuum getrocknet. Er wog 0,8426 g, das heisst ca. 1 mg weniger als der berechnete Aminosäurenrückstand.

Eine merkliche Gewichtsvermehrung durch Bindung von Formaldehyd hat also nicht stattgefunden.

Bei der relativ grossen Fehlergrenze des vorherigen Versuches wurde noch ein zweiter ausgeführt, bei dem eine grössere Menge Hydrolysat und vor allem mehr Formaldehyd zur Anwendung kam.

Ein Gemisch von 50 ccm Caseinhydrolysat mit 2,2153 g Aminosäuren und 50 ccm Formaldehydlösung mit 0,5080 g Formaldehyd wurde verschlossen 87 Tage aufbewahrt. In 20 ccm Gemischlösung waren somit 0,4430 g Aminosäuren und 0,1016 g Formaldehyd vorhanden. Die 20 ccm wurden der Wasserdampfdestillation unterworfen. In 500 ccm Destillat wurden 0,0838 g Formaldehyd nachgewiesen. Nicht destillierbar waren also 0,0178 g. Es wurden noch weitere 500 ccm Destillat aufgefangen. Der Destillationsrückstand wurde eingedampft und im Hochvacuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Er wog 0,4430 g, also genau soviel wie vor der Formaldehydzugabe.

Der Abnahme des destillierbaren Formaldehyds entspricht also keine Zunahme des Trockenrückstandes. Es darf daraus wohl geschlossen werden, dass sich der Formaldehyd nicht an gewisse Aminosäuren kondensiert, sondern dass er in andere, flüchtige Verbindungen verwandelt wird, vielleicht in Ameisensäure und Methanol, oder in Kohlensäure.

In einer letzten Versuchsreihe wurde geprüft, ob der nicht mehr destillierbare Formaldehyd zu Ameisensäure oxydiert worden war.

Dazu wurde wie folgt verfahren:

Es wurde vorerst versucht, eine bekannte, zugesetzte Menge Ameisensäure aus einem Caseinhydrolysat durch Wasserdampfdestillation über Phosphorsäure nach Franzen und Greve [82] zurückzugewinnen. Die Ameisensäure wurde im Destillat mit Natronlauge gegen Phenolphtalein titriert.

Nachdem festgestellt wurde, dass nach dieser Methode sämtliche Ameisensäure wieder entfernt werden konnte, wurde ein Gemisch aus Hydrolysat und Formaldehyd in gleicher Weise behandelt und im Destillat auf Ameisensäure untersucht.

10 ccm eines Hydrolysates, welches mit 23,3 mg Formaldehyd sterilisiert worden war, wurde nach 47 Tagen auf Ameisensäure geprüft. Im Destillat konnten nur 0,1 mg Ameisensäure nachgewiesen werden, eine Menge die auch in 2,33 °/oo Formaldehydlösung gefunden wurde.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 17

Bestimmung von Ameisensäure durch Wasserdampfdestillation aus einem Hydrolysat-Ameisensäuregemisch bzw. Hydrolysat-Formaldehydgemisch

Lösung	Dauer d. Einwirkung	Fraktionen Nr.	Fraktionen ccm	mg HCOOH gefunden	mg HCOOH zugegeben
Hydrolysat + Ameisensäure	1 Tag	1	240	9,4	
		2	250	2,6	12,6
		1+2	490	12,0	
Hydrolysat + Ameisensäure	6 Tage	1	240	95,3	
		2	250	19,1	
		3	250	8,2	125,8
		4	250	3,5	
		1-4	990	126,1	
10 ccm einer 2,33 °/oo Formaldehydlösung				0,1	
10 ccm Hydrolysat mit 2,33 °/oo Formaldehyd	47 Tage	1-3	740	0,1	

Eine Bildung von Ameisensäure aus Formaldehyd konnte also nicht nachgewiesen werden.

Es ist also nicht abgeklärt, in welche Substanz der Formaldehyd übergeht.

IV. Dialyse

A. Prinzip

Die Trennung von Kolloiden und Kristalloiden durch Dialyse ist ein schon lange bekanntes Verfahren. Zur Trennung kristalloider Substanzen voneinander konnte die Dialyse wegen der geringen Trennschärfe und kleinen Leistung nicht verwendet werden.

Eine entscheidende Verbesserung der Trennfähigkeit und Leistung wurde dadurch erreicht, dass erstens eine grosse Zahl von Dialysatorzellen in geeigneter Weise hintereinandergeschaltet wurden, und zweitens die verdünnten Lösungen, die aus einer Zelle austreten, konzentriert werden, ehe sie in eine Nachbarzelle gelangen. So entsteht eine Dialysierkolonne. An diese wird einerseits ein Gefäss mit der Lösung des zu trennenden Gemisches angeschaltet, andererseits eine Vorlage für die angereicherte Fraktion.

B. Bisherige Ergebnisse

Mit einem auf dem erwähnten Prinzip beruhenden Stufendialysator wurden Versuche an einem Gemisch Natriumchlorid- Natriumsulfat ausgeführt. (Cf. Dissertationen Koestler [13] und Hänni [14]).

Es stellte sich heraus, dass der Dialysator je nach Einstellung grosse oder kleine Trennschärfe besitzt. Trennschärfe und Tagesleistung stehen derart im Zusammenhang, dass grosse Trennschärfe mit kleinen Tagesleistungen verbunden sind und umgekehrt.

Es seien folgende Werte erwähnt (Diss. Hänni [14]):

Tabelle 18

Beziehung zwischen Trennschärfe und Tagesleistung im Dialysator

vorgelegt in der Ausgangslösung	gefunden in 24 h in der Vorlage	Anreicherung	Bemerkung
1 % Na_2SO_4 1 % NaCl	1,9 mg Na_2SO_4 1964 mg NaCl	1082	grosse Trennschärfe
1 % Na_2SO_4 1 % NaCl	2747 mg Na_2SO_4 17184 mg NaCl	6,28	kleine Trennschärfe

C. Das Bauprinzip des hier verwendeten Dialysators

Von den zwei möglichen Schaltungen zur Anreicherung der schwerst oder der leichtest dialysierenden Komponente aus einem Gemisch wurde die letztere gewählt. Auf Seite 63 ist der Apparat skizziert.

Das zu dialysierende Aminosäuregemisch befindet sich in Kolben (3). Es gelangt nach Konzentration in dem mit (B) bezeichneten Verdampfer in die erste Dialysatorzelle, wo es von unten nach oben einer Cellophanhaut entlang strömt. Auf der andern Seite der Membran strömt Wasser von oben nach unten. Die in der Lösung befindlichen Moleküle haben das Bestreben durch die Membran in das reine Lösungsmittel zu dialysieren. Wenn die Komponenten des Gemisches verschiedene Dialysekoeffizienten besitzen, wird eine kleine Verschiebung des Mengenverhältnisses eintreten. Auf der Dialysatseite der Membran sind die leichter dialysierenden Stoffe schwach angereichert. Dagegen ist die auf der Gemischseite der Zelle austretende Restlösung an den schwerer dialysierenden Komponenten etwas angereichert.

Die aus der rechten Seite der Dialysatorzelle austretende Dialysatlösung gelangt nach Durchströmen des Verdampfers (C) in die nächste Zelle und wird erneut der Dialyse unterworfen. Da aber zum vornherein beträchtlich weniger langsam dialysierende Aminosäuren vorhanden sind,

verschiebt sich das Verhältnis in der Dialysatlösung noch weiter zugunsten der rascher dialysierenden Aminosäuren. Diese Lösung wird nach derselben Schaltung weiter geführt.

Der Trenneffekt verstärkt sich von Zelle zu Zelle, sodass schliesslich eine Lösung in die Vorlage (4) gelangt, die vorwiegend rascher dialysierende Aminosäuren enthält.

Die austretenden Restlösungen werden mit den Dialysatlösungen aus den vorhergehenden Zellen vereint.

Die Trennschärfe kann reguliert werden durch Veränderung der Strömungsgeschwindigkeit in den linken Kammern (Restlösungsstrom) der Dialysatorzellen.

Grosse Strömungsgeschwindigkeit bewirkt grosse Trennschärfe bei kleinen Tagesleistungen. Die Geschwindigkeit der einzelnen Ströme wird in kleinen Tropfzählern mit der Stoppuhr gemessen. Es sind etwa 20 Tropfen = 1 ccm.

Was im Schema (Fig. 5) als eine Dialysatorzelle gezeichnet ist, stellt im Apparat eine Zellgruppe dar, bestehend aus mehreren hintereinandergeschalteten Zellen. (Cf. Seite 64 Fig. 7). In jeder Zellgruppe kann die Zahl der Membrane zu 2, 4, 6 oder 9 gewählt werden. (In Fig. 7 ist eine Zellgruppe mit 4 Zellen bzw. 4 Membranen dargestellt.) Die Fläche jeder Membran beträgt 176,7 cm^2. Vergrösserung der Membranfläche bewirkt wie die Herabsetzung der Strömungsgeschwindigkeiten eine Erhöhung der Tagesleistung.

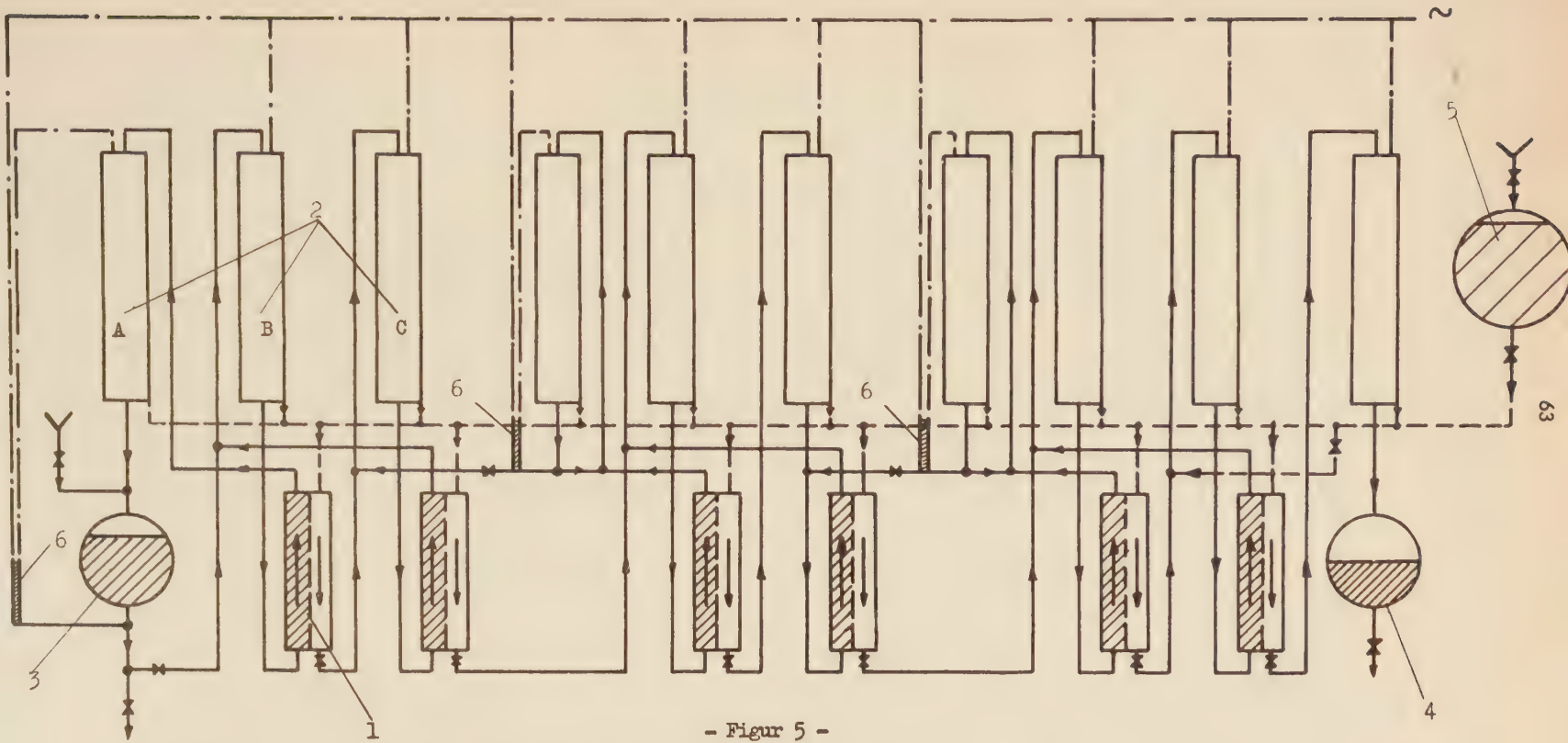
Jede Dialysatorzelle wird durch die Membran in zwei Kammern geteilt (Fig. 6). Die Tiefe der Kammer (Ab-

stand Membran - Zellwand) beträgt 0,12 cm. Jede Zellgruppe bildet mit dem zugehörigen Verdampfer eine Stufe (Fig. 5). Der verwendete Dialysator besteht aus 10 Stufen.

Jeder Verdampfer hat eine Leistung von 90 Watt. Aus dem Schema (Seite 63) geht hervor, dass nach jeder zweiten Stufe ein Zusatzverdampfer (z. Beispiel A) eingebaut ist. Diese zusätzlichen Konzentrationseinrichtungen werden als Regulierverdampfer bezeichnet. Sie haben die Aufgabe, das Volumen des Restlösungsstroms konstant zu halten.

Ueber die apparativen Einzelheiten sei hier auf die Dissertation Hänni verwiesen [14].

zur Anreicherung der raschen dialysierenden Komponenten.



- Figur 5 -

Leitungen für Lösung

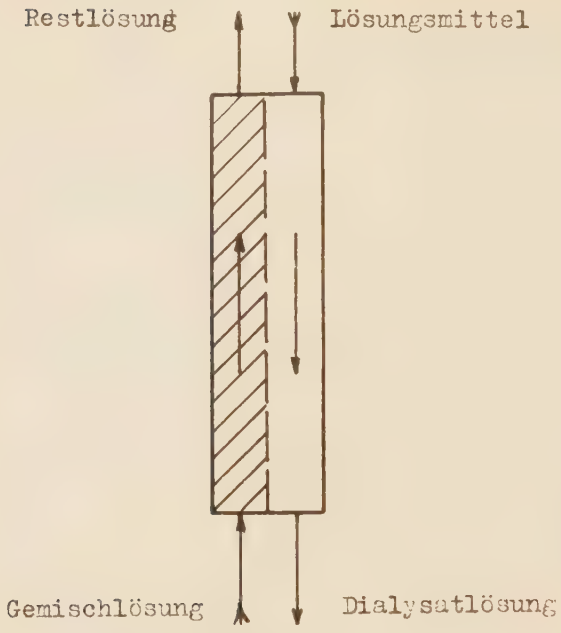
Leitungen für Lösungsmittel

elektrische Leitungen

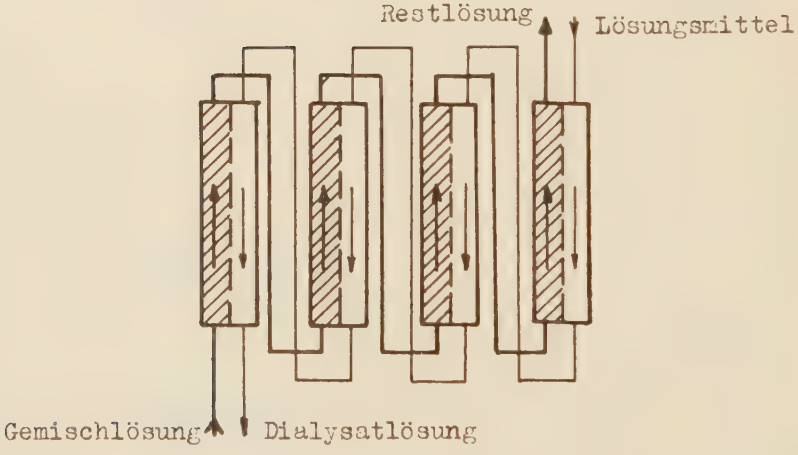
Drossel

1 Dialysierzellen
2 Verdampfer
3 Gemischlösung
4 Dialysatlösung
5 Lösungsmittel
6 Regler

D I A L Y S A T O R Z E L L E



Figur 6



Figur 7

D. Das Aminosäuregemisch als Objekt für den Dialysator

Das Aminosäuregemisch unterscheidet sich in einigen wesentlichen Punkten vom Salzgemisch Natriumchlorid - Natriumsulfat:

1. Statt einem binären Gemisch liegt hier ein solches vor, welches über 20 Komponenten enthält.

2. Die Dialysenkonstanten liegen weniger weit auseinander als bei den erwähnten Alkalisalzen. Polson bestimmte die Diffusionskonstanten einiger Aminosäuren (83). Um die Werte besser vergleichen zu können, wurde willkürlich diejenige des Glykokolls = 1 gesetzt. Die relativem Zahlen sind in der letzten Kolonne aufgeführt. Zum Vergleich sind ebenfalls die relativen Werte nach Graham (84) für Natriumchlorid und Natriumsulfat aufgenommen:

Tabelle 19

Diffusionskonstanten einiger Aminosäuren nach Polson

Stoff	Diffkonst.	MG	rel. Zahl
Glykokoll	95,0*	75	1
Alanin	82,6	89	0,869
Prolin	80,1	115	0,842
Valin	73,5	117	0,774

(Tabelle 19)

Stoff	Diffkonst.	MG	rel. Zahl
Leucin	63,3*	131	0,666
Tryptophan	61,4	204	0,646
Arginin	57,6	174	0,606
Natriumchlorid		58	1
Natriumsulfat		142	0,582

*) 10^{-7} cm^2 sek^{-1}

Man sieht aus der Tabelle, dass die Extremwerte der Aminosäuren weniger weit auseinanderliegen als bei den beiden Alkalisalzen.

Ueber die Diffusionskonstanten der übrigen Aminosäuren ist wenig bekannt. Man könnte versuchen, sie nach dem Vorgehen von Brintzinger auf Grund der Molekulargewichte zu berechnen. Man wendet dabei die Beziehung an:

$$D_1 \cdot \sqrt{M_1} = D_2 \cdot \sqrt{M_2}$$

M_1 und M_2 sind die Molekulargewichte zweier Stoffe, D_1 und D_2 die entsprechenden Dialysekoeffizienten. Dieser Berechnung sind jedoch enge Grenzen gesetzt (85,86).

3. Die Aufarbeitung der Fraktionen bei den Versuchen mit Natriumchlorid und Natriumsulfat gestaltete sich recht einfach. Die Lösung aus der Vorlage wurde zur Trockene gebracht. Die aus dem Desinfektionsmittel Formaldehyd

entstandenen Polyoxymethylenhydrate verflüchtigen sich bei einer Temperatur von 140° vollständig, sodass das Salzgemisch einfach gewogen und analysiert werden konnte.

Das Desinfektionsmittel musste bei den Aminosäuren auf andere Art quantitativ entfernt werden.

Das Verfahren wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

E. Durchführung der Dialyse

In Kolben (3) (Schema Seite 63) wurde ein Caseinhydrolysat gebracht, welches 101 g Aminosäuren enthielt. Es erhielt zur Sterilisation einen Formaldehydgehalt von 0,2 Prozent, ebenso das im Apparat benutzte Lösungsmittel.

Der Apparat war zu Beginn der Trennung auf grösste Trennschärfe bei geringen, täglich in der Vorlage anfallenden Substanzmengen, eingestellt.

Täglich wurde die Vorlage entleert und die sehr verdünnte Lösung aufgearbeitet. Zuerst wurde im Vacuum auf 100 bis 200 ccm eingedampft. Weiter konnte nicht konzentriert werden, da sonst das vorhandene Desinfektionsmittel als Polyoxymethylenhydrat ausfiel. Hierauf wurde der Hauptanteil des Formaldehyds durch Wasserdampfdestillation im Vacuum bei 50° entfernt. Nachdem ca. zwei Liter Destillat aufgefangen worden waren, wurde die Lösung weiter eingeengt und in einem kleinen Kolben solange im Vacuum mit Wasserdampf behandelt, bis in 20 ccm Destillat nicht mehr als 0,03 mg Formaldehyd nachgewiesen werden konnte. Dies war meistens der Fall, wenn die auf ein Kubikzentimeter konzentrierte Lösung mit dem Dampf von ca. einem Liter Wasser bahandelt worden war. Diese Lösung wurde in kleinen Prozellanschalen über Schwefelsäure im Vacuum zur Trockne

gebracht. Die Trocknung musste bei gewöhnlicher Temperatur erfolgen, weil die Fraktionen sich bei höherer Temperatur etwas nach braun verfärbten.

Ueber die so erhaltenen Fraktionen orientiert Tabelle 20:

Tabelle 20

Betriebsbedingungen des Dialysators
und tägliche Ausbeuten

Fraktionen		Strömungsgeschwindigkeit pro Zellgruppe in:		Membrane pro Zellgruppe	Ausbeuten pro Tag
Bezeichnung	Zahl	Tropfen pro min	ccm/min		
$A_1 - A_7$	7	52	2,60	2	0,0000 g
$B_1 - B_3$	3	45	2,25	2	0,0000 g
$C_1 - C_5$	5	40	2,00	2	0,0000 g
$D_1 - D_3$	3	30	1,50	2	0,0000 g
$E_1 - E_7$	7	45	2,25	4	0,0109 g
F	1	38	1,85	4	0,0096 g
$G_1 - G_{79}$	79	30	1,50	4	0,1-0,2g

Man sieht aus der Tabelle, dass zuerst während 7 Tagen die Fraktionen A_1 bis A_7 mit zwei Membranen pro Zellgruppe und der Strömungsgeschwindigkeit von 2,6 ccm auf der Lösungsseite der Membran erhalten wurden. Die Ausbeuten waren unmessbar gering, sodass die Strömungsgeschwindigkeiten herabgesetzt wurden. Dies führt immer zu einer Ausbeu-

teerhöhung, allerdings gekoppelt mit geringerer Trennschärfe, wie aus theoretischen Ueberlegungen, (unveröffentliche Arbeiten von P. von Tavel) und aus früheren Versuchen an Chlorid-Sulfat hervorgeht.

Auch mit der Strömungsgeschwindigkeit von 1,50 ccm war die Ausbeute noch zu gering. Hierauf kam bei den Fraktionen E_1 bis E_7 vom 18ten bis 25sten Tag die doppelte Membranfläche mit wieder etwas erhöhter Strömungsgeschwindigkeit zur Anwendung. Dabei wurden täglich etwa 10 mg Aminosäuren gefasst.

Um die Ausbeute noch weiter zu erhöhen, wurde die Strömungsgeschwindigkeit zuerst auf 1,85, dann auf 1,50 ccm gedrosselt. Die dabei erhaltenen Fraktionen G_1 bis G_{79} enthielten ca. 0,1 bis 0,2 g.

Zur Aufarbeitung wurden je drei Tagesfraktionen zusammengenommen.

Ueber die Mengenverhältnisse der so gewonnenen Proben orientiert Tabelle 21:

Tabelle 21

Die einzelnen Fraktionen der Gruppe G

Fraktionen	Ausbeuten in 72 Std.
1 - 3	0,2366 g
4,6,7	0,5123 g
8,10,11	0,5623 g
12 - 14	0,2745 g
15 - 17	0,3545 g
19 - 21	0,2497*g

*) Verluste bei der Behandlung mit Wasserdampf

(Tabelle 21)

Fraktionen	Ausbeuten in 72 Std.
25	0,1039* g
26 - 28	0,3279 g
29 - 31	0,2989 g
32 - 34	0,2618 g
35 - 37	0,3089 g
41 - 43	0,3847 g
44 - 46	0,3851 g
47 - 49	0,4729 g
50 - 52	0,5124 g
53 - 55	0,4360 g
56 - 58	0,3695 g
59 - 61	0,3899 g
62 - 64	0,2941 g
68 - 70	0,2616 g
71 - 73	0,2725 g
74 - 76	0,4301 g
77 - 79	0,5974 g

*) in 24 Stunden

Infolge Betriebsstörung im Dialysator musste der Versuch nach der Fraktion G_{79}, also insgesamt nach 105 Tagen abgebrochen werden.

V. Identifizierung der Fraktionen

Die Identifizierung der Salze Natriumchlorid und Natriumsulfat bei den früheren Versuchen mit dem Dialysator gestaltete sich recht einfach. Nachdem die Gesamtmenge der Salze in jeder Fraktion ermittelt worden war, wurde das Natriumchlorid nach der Halbmikromethode von Fajans massanalytisch bestimmt. Aus der Differenz ergab sich die Menge Sulfat.

In einem so komplexen Gemisch, wie es das Hydrolysat und auch das Dialysat darstellt, müssen möglichst viele charakteristische Analysendaten ermittelt werden. Dazu können dienen:

C, H und N Bestimmungen, Drehung der Ebene des polarisierten Lichtes, mikrochemische Reaktionen (typische Kupfersalze [87]), Molekulargewichtsbestimmungen.

Aber wenn auch alle verfügbaren Analysendaten bestimmt werden, kann die Zusammensetzung nur annähernd ermittelt werden. Zur genauen Identifizierung der Bestandteile in den Fraktionen müsste eine der verschiedenen Trennungsarten wie zum Beispiel die Estermethode von E. Fischer angewandt werden [4]. Diese Verfahren sind alle zeitraubend und eignen sich deshalb nicht gut zur Trennung kleiner Mengen Aminosäurengemisch.

Es besteht aber die Möglichkeit, aus einer einzigen Messung Anhaltspunkte über die Zusammensetzung der Fraktionen zu erhalten. Die im Casein enthaltenen Aminosauren weisen beispielsweise grosse Unterschiede im Molekulargewicht auf. Es liegt zwischen 75 (Glykokoll) und 204 (Tryptophan).

Molekulargewichte können besonders leicht und rasch nach der kryoskopischen Methode [88,89] bestimmt werden. Von Anslow [90] und Frankel [91] wurden bereits Bestimmungen an Aminosäuren ausgeführt.

Um eine erste Orientierung über die Trennwirkung des Dialysators zu erhalten, wurde diese Methode herangezogen.

A. Frühere Beobachtungen über Molekulargewichte der Aminosäuren

Anslow, Foster und Klingler [90] untersuchten Glykokoll in verschiedenen Konzentrationen und erhielten folgende Werte:

Tabelle 22

Kryoskopische Untersuchungen von Glykokoll Molekulargew: 75

molare Konz.	Gefrierpunktserniedrigung	Molekulargewicht gefunden
0,010	0,029°	48,6
0,100	0,195	71,9
0,212	0,389	76,1
0,394	0,710	77,2
0,589	1,035	79,2
0,796	1,382	80,3
1,036	1,769	81,7
1,274	2,121	83,8
1,617	2,679	84,2

Im Vergleich dazu erhielt Frankel [91] für Glykokoll bei verschiedenen Konzentrationen folgende Werte:

Tabelle 23

Kryoskopische Untersuchungen
von Glykokoll, Molekulargew.75

Substanz in g	Wasser in g	molare Konz.	dT^{o}	Molgew. gef.
0,0853	9,916	0,1146	0,194	74,8
0,1218	9,900	0,1640	0,302	76,6
0,1827	9,850	0,2473	0,448	77,9
0,4322	9,631	0,5983	1,034	81,4
0,6174	9,390	0,8766	1,473	83,9
0,7795	9,342	1,125	1,860	84,7
1,2180	8,977	1,809	2,890	88,3

dT^{o}= Gefrierpunktserniedrigung

Die Werte der beiden Versuchsreihen sind in Fig. 8 graphisch dargestellt. Die gefundenen Molekulargewichte sind in Abhängigkeit der molaren Konzentration aufgetragen.

Es zeigte sich, dass bei Konzentrationen unter 0,1 Mol pro Liter kleinere Werte als der theoretische von 75 gefunden werden, während bei höherer Konzentrationen Werte über dem theoretischen auftreten. Dies wird auf Assoziation zurückgeführt.

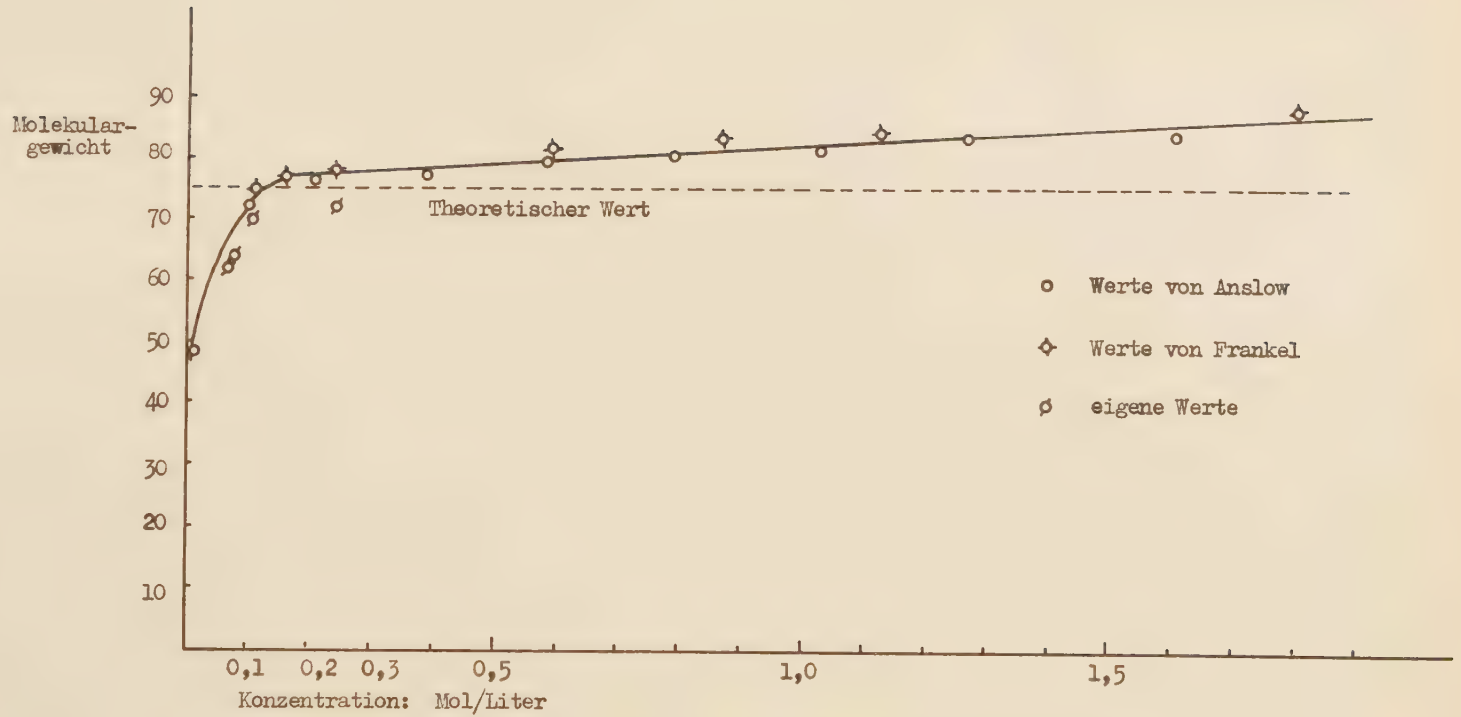


Fig. 8: Kryoskopische Untersuchungen von G l y k o k o l l
Molekulargewicht in Abhängigkeit der molaren Konzentration

Derselbe Autor bestimmte nach der gleichen Methode die Molekulargewichte folgender Aminosäuren bei verschiedenen Konzentrationen [91]:

Tabelle 24

Kryoskopische Untersuchungen
von dl-Alanin, Molekulargew. 89

Substanz in g	Wasser in g	molare Konz.	dT^o	Molgew. gef.
0,2342	9,793	0,269	0,510	88,7
0,7850	9,303	0,948	1,775	89,3
1,1710	8,964	1,468	2,750	90,2
1,3196	8,826	1,680	3,103	90,4

Tabelle 25

Kryoskopische Untersuchungen
von l-Alanin, Molekulargew. 89

Substanz in g	Wasser in g	molare Konz.	dT^o	Molgew. gef.
0,1113	9,909	0,126	0,239	88,0
0,2670	9,766	0,307	0,574	89,1
0,5435	9,5231	0,641	1,204	88,4
1,2040	8,948	1,512	2,822	89,9

Tabelle 26

Kryoskopische Untersuchungen
von l-Leucin, Molekulargew. 131

Substanz in g	Wasser in g	molare Konz.	dT^o	Molgew. gef.
0,1660	9,840	0,1287	0,244	129,2
0,2414	9,600	0,1918	0,370	129,7

Tabelle 27

Kryoskopische Untersuchungen
von dl-Valin, Molekulargew. 117

Substanz in g	Wasser in g	molare Konz.	dT^{o}	Molgew. gef.
0,1863	9,834	0,1618	0,308	112,4
0,2622	9,737	0,230	0,467	110,4
0,3802	9,660	0,3361	0,683	111,1
0,5432	9,526	0,4859	0,954	113,1

Tabelle 28

Kryoskopische Untersuchungen
von d-Arginin, Molekulargew. 174

Substanz in g	Wasser in g	molare Konz.	dT^{o}	Molgew. gef.
0,228	9,808	0,1335	0,201	220,7
0,456	9,617	0,2722	0,406	222,3
0,9120	9,232	0,5672	0,795	236,6
1,2160	8,979	0,7776	1,072	240,5

Tabelle 29

Kryoskopische Untersuchungen
von l-Prolin, Molekulargew. 115 (92)

Substanz in g	Wasser in g	molare Konz.	dT^{o}	Molgew. gef.
0,2006	10,0	0,1742	0,357	106,1
0,1171	10,0	0,1017	0,219	101,3

Tabelle 30 (aus Lit.92)

Kryoskopische Untersuchungen
von l-Oxyprolin, Molekulargew. 131

Substanz in g	Wasser in g	molare Konz.	dT^o	Molgew. gef.
0,1233	10,0	0,0940	0,198	117,2
0,2034	10,0	0,1552	0,325	117,8

Tabelle 31

Kryoskopische Untersuchungen
von l-Histidin, Molekulargew. 155

Substanz in g	Wasser in g	molare Konz.	dT^o	Molgew. gef.
0,2437	10,0	0,1571	0,305	152,3
0,2451	10,0	0,1563	0,305	152,2

Tabelle 32

Kryoskopische Untersuchungen
von Glutaminsäure, Molekulargew.147

Substanz in g	Wasser in g	molare Konz.	dT^o	Molgew. gef.
		0,0045	0,0083	148,7*
		0,0141	0,0259	148,3*
		0,0242	0,0435	152,3*
0,1539	10,0	0,1046	0,212	138,2‡

‡) nach Frankel (92)
*) nach Hoskins (93)

Bei den meisten Aminosäuren stimmt das bei verschiedenen Konzentrationen kryoskopisch bestimmte Mo-

lekulargewicht mit dem theoretischen recht gut überein. Beträchtliche Abweichungen treten infolge Assoziation beim Arginin auf.

Auch über das Verhalten von Aminosäurengemischen sind Untersuchungen ausgeführt worden. Ueber die Gefrierpunktserniedrigung von binären Aminosäurengemischen liegen einige Beobachtungen von Frankel vor (92,94).

Die Auswertung dieser Versuche sei am Aminosäurepaar Arginin-Asparaginsäure erläutert:

0,7982 g Arginin + 0,4030 g Asparaginsäure geben in 10 ccm Wasser eine Gefrierpunktserniedrigung von 1,260° . Daraus ergibt sich das mittlere Molekulargewicht der Mischung, also der 1,2012 g Aminosäuren zu 179,0.

Theoretisch kann das Molekulargewicht des Gemisches aus den Komponenten wie folgt berechnet werden:

In der Annahme, dass beide Aminosäuren das Raoult'sche Gesetz streng erfüllen, bewirken die 0,7982 g Arginin eine Erniedrigung des Gefrierpunktes von 0,853°, und die 0,4030 g Asparaginsäure eine solche von 0,562°. Liegt die Mischung der beiden Aminosäuren im genannten Verhältnis vor, und verhalten sich die Gefrierpunktserniedrigungen additiv, so ergibt sich ein Molekulargewicht von 157,8.

Bleibt aber das Arginin assoziiert (Cf. Tabelle 28) und bewirkt damit eine kleinere Erniedrigung, nämlich 0,645°, so ergibt sich daraus ein mittleres Molekulargewicht der Mischung zu 184,9.

Entsprechend wurden die Auswertungen der andern Aminosäuremischungen vorgenommen.

Tabelle 33

Kryoskopische Untersuchungen an Aminosäurengemischen

Aminosäuren in 10 g Wasser Einwaage in g	dT^{o}	Molgew. gef.	Molekulargewichte theoretisch	
			Arginin nicht assoziiert	Arginin assoziiert
0,7982 g Arginin 0,4030 g l-Asparaginsäure	1,260	179,0	157,8	184,9
0,4624 g Arginin 0,1692 g Glutaminsäure	0,810*	185,6	166,0	197,0
0,1823 g Arginin 0,2006 g Prolin	0,542	135,0	137,3	148,9
0,2437 g Histidin 0,2107 g Asparaginsäure	0,590	146,7	144,1	
0,1936 g Prolin 0,2485 g Histidin	0,637	132,2	134,6	

*) in 8 g Wasser

Man sieht, dass besonders beim Arginin bessere Werte für das Molekulargewicht erhalten werden, wenn in der Mischung andere Aminosäuren vorhanden sind.

Die übrigen angeführten Aminosäuren ergeben einzeln und in Mischungen normale Molekulargewichte.

Auch das Verhalten von Glykokoll in Aminosäurelösungen wurde untersucht.

Hier wurde eine gleich grosse Menge Glykokoll in Wasser, in Leucin- und Valinlösung aufgelöst und kryoskopiert. Aus der durch Glykokoll zusätzlich hervorgebrachten Gefrierpunktserniedrigung der Lösungen wurde sein Molekulargewicht berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 34 zusammengestellt:

Tabelle 34

Molekulargewicht des Glykokolls in Gegenwart von Leucin oder Valin

Aminosäuren in 10 g Wasser	dT^o	Molgew. gef.	Molgew. Theor.
0,6358 g Glykokoll allein	1,504	80,1	75
In Anwesenheit von 0,187 g Leucin bewirken 0,6358 g Glykokoll ein dT^o der Leucinlösung von	1,560	77,1	75
In Anwesenheit von 0,336 g Valin bewirken 0,6358 g Glykokoll ein dT^o der Valinlösung von	1,665	71,4	75

Aus Tabelle 34 geht hervor, dass auch die Assoziation des Glykokolls in Gegenwart anderer Aminosäuren zurückgeht.

B. Eigene Versuche

Die Molekulargewichte der Dialysatfraktionen wurden ebenfalls kryoskopisch bestimmt.

Die Apparatur wurde nach den Angaben von Beckmann (89) zusammengestellt. Abgeändert wurden folgende Apparatenteile:

1. Der Rührer wurde mechanisch durch ein Exzenter bewegt, welches auf der horizontalen Welle eines kleinen Elektromotors befestigt war.

2. Die Substanzeinwaage erfolgte in kleinen Glasschalen (10 x 10 mm) mit flachem Boden. Diese blieben während der Bestimmung im Gefriergefäss. Auf diese Weise war es möglich, die honigartigen Aminosäurengemische leicht quantitativ in das Gefriergefäss zu bringen.

Es wurden zuerst einige Bestimmungen mit reinen Aminosäuren durchgeführt und anschliessend mit den Fraktionen aus dem Dialysator.

1. Bestimmung der Molekulargewichte reiner Aminosäuren

Tabelle 35

Glykokoll,MG 75

molare Konz.	Gefrierpunktserniedrigung	Molekulargewicht
0,067	0,152	61,6
0,075	0,167	63,2
0,108	0,218	69,5
0,240	0,466	71,9

Die erhaltenen Werte sind ebenfalls in Fig. 8 (Seite 76) aufgenommen. Um richtige Molekulargewichte zu erhalten, muss 0,1 bis 0,2 Mol eingewogen werden.

Tabelle 36

Alanin, MG 89

molare Konz.	Gefrierpunktserniedrigung	Molekulargewicht
0,055	0,126	72,2
0,056	0,128	73,4
0,084	0,165	84,1
0,230	0,452	85,3

Auch beim Alanin liefert die Methode bei genügender Konzentration brauchbare Werte.

2. Bestimmung der Molekulargewichte der Dialysatfraktionen

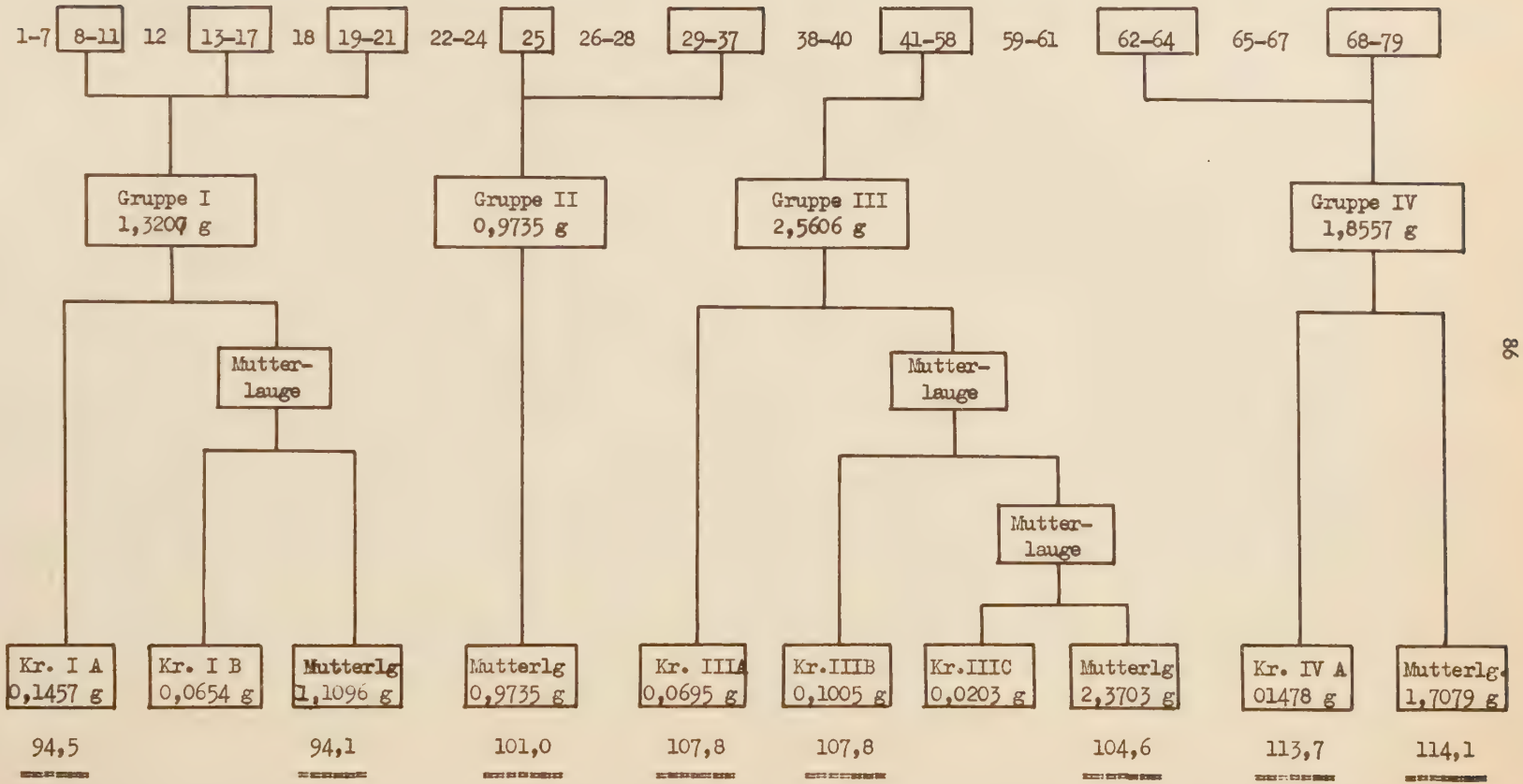
Nachdem die Methodik an Hand von Testversuchen ausprobiert worden war, wurden die Fraktionen aus dem Dialysator für die Molekulargewichtsbestimmungen vorbereitet:

Nach Bestimmung der täglichen Ausbeuten (Cf. Abschnitt IV, Tabelle 21, Seiten 70/71) wurden die Schalen mit den Fraktionen während längerer Zeit an der Luft aufbewahrt. Hiebei wurde von den Fraktionen Feuchtigkeit aufgenommen. Es bildeten sich halbflüssige Massen, in denen teilweise Kristallisation eintrat. Es wurden daher die Kristalle von den Mutterlaugen abgetrennt.

Dazu wurden 10 bis 20 Fraktionen mit 2 bis 5 ccm Wasser versetzt, damit der flüssige Anteil die Zähigkeit verringerte und quantitativ von den Kristallen getrennt werden konnte. Auf diese Weise wurden die Fraktionen in vier Gruppen zusammengefasst. Wie aus Tabelle 37 (Seite 86) zu ersehen ist, wurden einige Fraktionen nicht aufgearbeitet. Diese waren entweder thermisch zersetzt (Fraktionen 1 - 7, 12, 18), unrein (Fraktionen 59 - 61, 65 - 67), oder wurden zu Nebenversuchen verwendet (Fraktionen 22 - 24, 26 - 28, 38 - 40).

Die Kristalle wurden auf einem Filter gesammelt. Es waren dies aus Gruppe I: Kr. I A, aus Gruppe III: Kr. III A und aus Gruppe IV: Kr. IV A.

Tabelle 37: A u f a r b e i t u n g d e r D i a l y s a t f r a k t i o n e n $G_1 - G_{79}$



Die verbleibenden Mutterlaugen wurden über konzentrierte Schwefelsäure wieder konzentriert, wobei von neuem Kristalle auftraten. So konnten aus Gruppe I die Kristalle IB, aus Gruppe III die Kristalle IIIB gewonnen werden. Aus dieser Gruppe konnte noch eine weitere kleine Menge Kristalle gewonnen werden (Kr. IIIC). Nach Erreichen einer gewissen Viskosität der Mutterlauge traten keine Kristalle mehr auf.

Nun wurden die verschiedenen Kristalle und Mutterlaugen auf Molekulargewichte geprüft. Dazu wurde wie folgt verfahren:

Da bei den Molekulargewichtsbestimmungen die Substanzen entweder absolut trocken, oder einen definierten Wassergehalt aufweisen müssen, wurden die Schalen mit den Mutterlaugen in einem geschlossenen Gefäss neben gesättigter Natriumchloridlösung mit festem Bodenkörper aufbewahrt, wo eine relative Feuchtigkeit von 75 % herrscht [95].

Die Aminosäuren wurden feucht in die erwähnten Schalen eingewogen und in die Beckmannapparatur gebracht. In einer Parallelprobe wurde der Feuchtigkeitsgehalt ermittelt, indem sie im Hochvacuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Die so ermittelte Feuchtigkeit wurde bei der Ausrechnung der Molekulargewichte zum Lösungsmittel gerechnet.

Die Messungen wurden in zwölf Kubikzentimeter Lösungsmittel ausgeführt. Die Gefrierpunktserniedrigung sollte 0,1 bis 0,2° betragen, damit die Messgenauigkeit ge-

nügend gross wurde. Um diese Bedingung zu erfüllen, durfte die Einwaage bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 100 nicht weniger als 0,1 g betragen.

Aus diesem Grunde wurden die Kristalle III A und III B zusammengenommen. Das Molekulargewicht der Kristalle I B und III C konnte wegen der zu kleinen Quantitäten nach dieser Methode nicht bestimmt werden.

In Tabelle 38 sind die ermittelten Molekulargewichte zusammengestellt:

Tabelle 38

Molekulargewichte der durch Dialyse erhaltenen Aminosäurefraktionen

Aminosäuren	Einwaage in g	Trockengehalt in %	Trockengehalt in g	dT^{o}	Molekulargewicht
Gruppe I					
Kristalle A	0,1196	77,95	0,0933	0,153	94,5
Mutterlauge	0,4767	58,92	0,2808	0,452	94,8
Mutterlauge	0,3434	60,09	0,2063	0,339	93,4
Gruppe II					
Mutterlauge	0,3466	62,28	0,2158	0,328	100,9
Mutterlauge	0,4035	61,66	0,2488	0,377	101,0
Gruppe III					
Kristalle A+B	0,1393	95,86	0,1335	0,192	107,8
Mutterlauge	0,3122	60,08	0,1876	0,276	104,3
Mutterlauge	0,5288	59,95	0,3171	0,461	104,8
Gruppe IV					
Kristalle A	0,1302	95,69	0,1246	0,170	113,7
Mutterlauge	0,2231	64,54	0,1440	0,196	113,1
Mutterlauge	0,3819	62,00	0,2368	0,314	115,5
Hydrolysat	0,3318	72,73	0,2413	0,289	128,5
Hydrolysat	0,3231	72,52	0,2343	0,280	128,8

Man erkennt, dass die Molekulargewichte sämtlicher Fraktionen kleiner sind als das mittlere Molekulargewicht des Caseinhydrolysates. Von den vorgelegten 101 g Aminosäuren (Cf. Seite 68) wurden insgesamt 8,39 g oder 8,30 Prozent in der Vorlage gefasst.

Dies entspricht der Tatsache, dass in diesem kleinen Anteil die raschest dialysierenden Aminosäuren gefasst wurden.

Das Molekulargewicht nimmt systematisch von Gruppe zu Gruppe zu. Es beträgt für die erste Gruppe 94,2, für die zweite Gruppe 101,0, für die dritte Gruppe 105,6 und für die vierte Gruppe 114,1. Die Zusammensetzung verschiebt sich somit zugunsten höherer molekularen Aminosäuren.

Zusammenfassung

1. Es wurden Versuche zur eventuellen Verbesserung der Hydrolyse von Eiweissstoffen ausgeführt. Es wurden Spaltungen mit Schwefelsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Essigsäure-Essigsäureanhydrid, Essigsäure-Oleum, Natronlauge und Dimethylsulfat versucht. Dabei wurde bestätigt, dass die übliche Spaltung mit starken Mineralsäuren nicht leicht zu verbessern ist.

2. Es wurde geprüft, ob Kupfersalze der Aminosäuren von Mikroorganismen angegriffen werden. Ferner wurde die sterilisierende Wirkung von Formaldehyd auf Eiweisshydrolysate untersucht. Bei Kupfersalzen ist nur bei hohen Konzentrationen Sterilität vorhanden. Formaldehyd verhindert in einer Konzentration von 1 °/oo die Entwicklung von Mikroorganismen.

Formaldehyd kann aus Eiweisshydrolysaten durch Destillation mit Wasserdampf zum grössten Teil entfernt werden. Der im Destillat nicht nachweisbare Anteil erhöht das Gewicht des Trockenrückstandes nicht. Wahrscheinlich findet eine Umwandlung in flüchtige Verbindungen statt, die bei der Formaldehydbestimmung nicht

erfasst werden.

3. Aus einem Caseinhydrolysat wurden im Stufendialysator die leichtest dialysierenden Anteile ausgesondert. Die gewonnenen Fraktionen haben ein niedriges Molekulargewicht. Dieses liegt wesentlich unter dem mittleren Molekulargewicht der Mischung. Dies entspricht der Tatsache, dass von der ganzen Mischung nur ein kleiner Anteil in die Vorlage übergetreten ist. Von Fraktion zu Fraktion nimmt das Molekulargewicht systematisch zu.

Literatur

1)	Braconnot	Ann. chim.	13,	113,	(1820)
2)	Liebig	Ann.	57,	127,	(1846)
3)	Ritthausen	J. prakt. Chemie	3,	314,	(1871)
4)	Fischer E.	Untersuchungen über Aminosäuren			(1906)
5)	Horn, Jones	J. biol. chemistry	138,	141,	(1941)
6)	Hofmeister	Erg. der Physiol.	1,	759,	(1902)
7)	Fischer	Ber.	35,	1095,	(1902)
8)	Abderhalden	Naturwiss.	12,	716,	(1924)
9)	Waldschmidt-Leitz	Z. physiol. Chemie	244,	221,	(1936)
10)	Dakin	Biochem. Journal	12,	290,	(1918)
11)	Town	Biochem. Journal	30,	1837,	(1936)
12)	Ross	J. biol. chemistry	143,	685,	(1942)
13)	Koestler	Dissertation, Bern			(1941)
14)	Hänni	Dissertation, Bern			(1943)
15)	Sutermeister	Casein and its industrial applications			(1939)
16)	Abderhalden	Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden	II,	384,	(1910)
17)	Skraup	Monatshefte	31,	143,	(1910)
18)	Skraup	Monatshefte	31,	149,	(1910)
19)	Fujita	Tohoku J. exp. med.	34,	339,	(1938)
20)	Abderhalden	Z. physiol. Chemie	131,	284,	(1923)
21)	Salkowski	Biochem. Z.	133,	1,	(1922)
22)	Town	Biochem. Journal	22,	1083,	(1928)
23)	Foreman	Biochem. Journal	13,	378,	(1919)
24)	Albanese	J. biol. chemistry	134,	467,	(1940)
25)	Yoritaka	Z. physiol. Chemie	270,	44,	(1941)
26)	Ritthausen	J. prakt. Chemie	103,	193,	(1868)
27)	Hlasiwetz Habermann	Ann.	169,	150,	(1873)
28)	Gortner	J. am. chem. Soc.	37,	1630,	(1915)
29)	Ssadikow Zelinsky	Biochem. Z.	136,	241,	(1923)
30)	Kassell	J. biol. chemistry	125,	145,	(1938)
31)	Cherbuliez	Helv. chim. acta	11,	1252,	(1928)
32)	Habermann	Z. physiol. Chemie	35,	231,	(1902)

33)	Lieben	Biochem. Z.	145,	535,	(1924)
34)	Nasset	J. am. chem. Soc.	51,	836,	(1929)
35)	Ssadikow Zelinsky	Biochem. Z.	137,	401,	(1923)
36)	Isgarischew	Koll. Z.	38,	235,	(1926)
37)	Loiseleur	Bull. Soc. chim. biol.	14,	1088,	(1932)
38)	Zelinsky	Biochem. Z.	137,	397,	(1923)
39)	Ssadikow	Biochem. Z.	136,	238,	(1923)
40)	Bergmann	Biochem. Z.	203,	280,	(1928)
41)	Skraup	Monatshefte	30,	289,	(1909)
42)	Levene	J. biol. chemistry	78,	145,	(1928)
43)	Herzfeld	Biochem. Z.	56,	82,	(1913)
44)	Riesser	Z. physiol. Chemie	196,	201,	(1931)
45)	Christomanos	πρακτικά	11,	211,	(1936)
46)	Christomanos	πρακτικά	12,	113,	(1937)
47)	Abderhalden	Z. physiol. Chemie	269,	28,	(1941)
48)	Fränkel	Biochem. Z.	110,	287,	(1920)
49)	Griggs	Jour. ind. eng. chem.	13,	1027,	(1921)
50)	Ssadikow	Biochem. Z.	205,	360,	(1929)
51)	Komatsu	Bull. chem. Soc. Japan	1,	102,	(1926)
52)	Graves	J. am. chem. Soc.	39,	112,	(1917)
53)	Christomanos	Biochem. Z.	277,	394,	(1935)
54)	Fodor und Kuk	Biochem. Z.	240,	123,	(1931)
55)	Jirgensons	J. prakt. Chemie	159,	303,	(1941)
56)	Cherbuliez	Helv. chim. acta	14,	163,	(1931)
57)	Edlbacher	Z. physiol. Chemie	112,	80,	(1921)
58)	Waldschmidt-Leitz	Z. physiol. Chemie	236,	181,	(1935)
59)	Felix und Mager	Z. physiol. Chemie	249,	111,	(1937)
60)	Abderhalden Voegtlin	Z. physiol. Chemie	53,	315,	(1907)
61)	Dunn und Lewis	J. biol. chemistry	49,	343,	(1921)
62)	Sörensen	Biochem. Z.	7,	45,	(1908)
63)	Schiff	Ann.	310,	25,	(1899)
64)	Pertzoff	J. biol. chemistry	79,	799,	(1928)
65)	Abderhalden	Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden I	7,	19,	(1922)
66)	Abderhalden	Z. physiol. Chemie	265,	31,	(1940)

67)	Tangl	Archiv f. Physiologie	121,	534,	(1908)
68)	Nitschmann Hadorn	Helv. chim. acta	26,	1084,	(1943)
69)	Abderhalden Schnitzler	Z. physiol. Chemie	163,	94,	(1927)
70)	Hofmeister	Ann.	189,	6,	(1877)
71)	Abderhalden Schnitzler	Z. physiol. Chemie	164,	37,	(1927)
72)	Borsook Thimann	J. biol. chemistry	98,	671,	(1932)
73)	Svehla	Ber.	56,	331,	(1923)
74)	Baur	Helv. chim. acta	24,	1018,	(1941)
75)	Baur	Helv. chim. acta	23,	233,	(1940)
76)	Holden Freeman	aust.J.biol.med.sci.	8,	189,	(1931)
77)	van Slyke	Ber.	43,	3170,	(1910)
78)	Wadsworth Pangborn	J. biol. chemistry	116,	423,	(1936)
79)	Nitschmann Hadorn	Helv. chim. acta	24,	237,	(1941)
80)	Nitschmann Hadorn Lauener	Helv. chim. acta	26,	1069,	(1943)
81)	Franzen Fellmer	J. prakt. Chemie	95,	299,	(1917)
82)	Franzen Greve	J. prakt. Chemie	80,	368,	(1909)
83)	Polson	Biochem. J.	31,	1903,	(1937)
84)	Graham	Z. physik. Chemie	59,	691,	(1907)
85)	Brintzinger	Z. allg. anorg. Chemie	196,	33,	(1931)
86)	Brintzinger	Z. allg. anorg. Chemie	224,	365,	(1935)
87)	Werner	Mikrochemie	1,	33,	(1923)
88)	Raoult	Z. physik. Chemie	27,	617,	(1898)
89)	Beckmann	Z. physik. Chemie	44,	161,	(1903)
90)	Anslow Foster Klingler	J. biol. Chemistry	103,	81,	(1933)
91)	Frankel	Biochem. Z.	217,	386,	(1930)
92)	Frankel	Biochem. Z.	242,	67,	(1931)
93)	Hoskins Randall Schmidt	J. biol. chemistry	88,	215,	(1930)
94)	Frankel	Biochem. Z.	241,	94,	(1931)
95)	Obermiller Goertz	Z. physik. Chemie	109,	145,	(1924)

Lebenslauf

Am 29. Januar 1916 wurde ich in Genf geboren. In Biel besuchte ich vier Jahre die Primarschule. Dann trat ich in das Progymnasium und später in die Literarabteilung des Gymnasiums über. Im Herbst 1935 bestand ich die Maturitätsprüfung. Im gleichen Jahr immatrikulierte ich mich an der Universität Bern, wo ich Chemie, Physik und Botanik studierte.

Während drei Semestern war ich Assistent bei Herrn Prof. Signer, unter dessen Leitung ich meine Dissertation ausführte.